

**Membrangebundenes IL-17A und IL-17F zur  
Herstellung spezifischer monoklonaler Antikörper  
für die intrazytoplasmatische Zytokinfärbung**

von  
Isabelle Walliser

Inaugural-Dissertation zur Erlangung der Doktorwürde  
der Tierärztlichen Fakultät  
der Ludwig-Maximilians-Universität München

**Membrangebundenes IL-17A und IL-17F zur  
Herstellung spezifischer monoklonaler Antikörper  
für die intrazytoplasmatische Zytokinfärbung**

von  
Isabelle Walliser  
aus  
Ulm

München 2017

Aus dem Veterinärwissenschaftlichen Department  
der Tierärztlichen Fakultät  
der Ludwig-Maximilians-Universität München  
Lehrstuhl für Tierphysiologie

Arbeit angefertigt unter der Leitung von  
Univ.-Prof. Dr. Thomas Göbel

**Gedruckt mit Genehmigung der Tierärztlichen Fakultät  
der Ludwig-Maximilians-Universität München**

**Dekan:** Univ.-Prof. Dr. Reinhard K. Straubinger, PhD

**Berichterstatter:** Univ.-Prof. Dr. Thomas Göbel

**Korreferent/en:** Univ.-Prof. Dr. Hermann Ammer  
Univ.-Prof. Dr. Kaspar Matiasek  
Univ.-Prof. Dr. Johannes Hirschberger  
Priv.-Doz. Dr. Karin Weber

**Tag der Promotion: 29. Juli 2017**

**In Liebe und Dankbarkeit meinen Eltern gewidmet**

# Inhaltsverzeichnis

<b>1</b>	<b>Einleitung .....</b>	<b>1</b>
<b>2</b>	<b>Zielsetzung.....</b>	<b>3</b>
<b>3</b>	<b>Literaturübersicht.....</b>	<b>4</b>
<b>3.1</b>	<b>IL-17 Zytokine beim Säuger .....</b>	<b>4</b>
3.1.1	<i>IL-17 Familie .....</i>	<i>4</i>
3.1.2	<i>Struktur der IL-17 Zytokine .....</i>	<i>5</i>
3.1.3	<i>Bildung der IL-17 Zytokine .....</i>	<i>6</i>
3.1.4	<i>Rezeptoren der IL-17 Zytokine .....</i>	<i>11</i>
3.1.5	<i>Funktion der IL-17 Zytokine.....</i>	<i>14</i>
3.1.6	<i>Bedeutung von IL-17A und IL-17F in der Wirtsabwehr.....</i>	<i>16</i>
<b>3.2</b>	<b>IL-17 beim Haushuhn.....</b>	<b>17</b>
3.2.1	<i>Gallus gallus (gg) IL-17 Familie.....</i>	<i>17</i>
3.2.2	<i>Struktur der gg IL-17 Zytokine .....</i>	<i>19</i>
3.2.3	<i>Bildung der gg IL-17 Zytokine .....</i>	<i>19</i>
3.2.4	<i>Rezeptoren der gg IL-17 Zytokine .....</i>	<i>19</i>
3.2.5	<i>Funktion der gg IL-17 Zytokine.....</i>	<i>20</i>
3.2.6	<i>Bedeutung von gg IL-17A und gg IL-17F in der Wirtsabwehr</i>	<i>21</i>
3.2.7	<i>Anwendung von gg IL-17A .....</i>	<i>22</i>
<b>4</b>	<b>Publikation .....</b>	<b>23</b>
<b>5</b>	<b>Diskussion .....</b>	<b>32</b>
<b>6</b>	<b>Zusammenfassung.....</b>	<b>40</b>
<b>7</b>	<b>Summary .....</b>	<b>42</b>
<b>8</b>	<b>Literaturverzeichnis .....</b>	<b>43</b>
<b>9</b>	<b>Danksagung.....</b>	<b>53</b>

## Abkürzungsverzeichnis

AP-1	Aktivator-Protein 1
C. rodentium	Citrobacter rodentium
C/EBP	CCAAT/Enhancer-Binding-Protein
CCL	CC-Chemokinligand
CCR 6	Chemokinrezeptor 6
CD	Cluster of Differentiation
cDNA	komplementäre DNA (engl. complementary DNA)
c-JNK	c-Jun-N-terminale Kinase
CTLA	Zytotoxisches T-Lymphozyten- Antigen
CXCL	CXC-Chemokinligand
ELISA	Enzyme-linked Immunosorbent Assay
ERK	Extrazellulär-signalregulierte Kinasen
EST	Expressed Sequence Tag
Fcε-Rezeptor	Fc-epsilon-Rezeptor
FoxP3	Forkhead-box-Protein P3
G-CSF	Granulozyten-Kolonie-stimulierender Faktor
GG	Gallus gallus
GM-CSF	Granulozyten-Makrophagen-Kolonie-stimulierender Faktor
Gp130	Glykoprotein 130
GPI	Glykosylphosphatidylinositol
HEK Zellen	Humane Embryonale Nierenzellen (engl. Human Embryonic Kidney cells)
IEL	Intraepitheliale Lymphozyten
IFN	Interferon
Ig	Immunglobulin
IL	Interleukin
IL-17R	Interleukin-17-Rezeptor
IL-1R	Interleukin-1-Rezeptor
IL-23R	Interleukin-23-Rezeptor
ILC	Innate Lymphoid Cells
kDa	Kilodalton
LT	Lymphotoxin
LTi-like	Lymphoid Tissue inducer-like
mab	monoclonal antibody
mAK	Monoklonaler Antikörper
MAPK	Mitogen-Aktivierte Proteinkinasen

MHC	Haupt-Histokompatibilitätskomplex (engl. Major Histocompatibility Complex)
MMP	Matrix-Metalloproteinasen
mRNA	messenger RNA
NCBI	National Center for Biotechnology Information
NF- $\kappa$ B	Nuclear Factor- $\kappa$ B
NK	Natürliche Killerzelle
NKT	Natürliche Killer-T-Zelle
ORF	Offener Leserahmen (engl. Open Reading Frame)
PRR	Pattern Recognition Receptor
qPCR	quantitative Echtzeit-PCR
ROR	Retinoid-Related Orphan Receptor
S. aureus	Staphylococcus aureus
SEFIR	Similar Expression to Fibroblast Growth Factor Genes and IL-17R
SOCS	Suppressor of Cytokine Signaling
STAT	Signal Transducer and Activator of Transcription
TAK1	Transforming growth factor beta-Activated Kinase 1
TCR	T-Zellrezeptor
TGF- $\beta$	Transforming Growth Factor beta
Th	T-Helferzelle
TILL	TIR-like loop
TIR	Toll-ähnliche/IL-1R-Domäne
TLR	Toll-ähnlicher Rezeptor
TNF- $\alpha$	Tumor Necrosis Factor alpha
TRAF	Tumor Necrosis Factor Receptor- Associated Factor
Treg	Regulatorische T-Zelle



## **Abbildungsverzeichnis**

Abbildung 1: Differenzierungswege naiver CD4 <sup>+</sup> T- Zellen.....	7
Abbildung 2: IL-17-Rezeptoren .....	13
Abbildung 3: Phylogenetische Analyse der Zytokine IL-17A, IL-17D und IL-17F .....	18
Abbildung 4: Glykosylphosphatidylinositol (GPI) -Anker.....	34

## 1 Einleitung

Die Erforschung der Immunzellen sowie der immunregulatorischen Moleküle im Haushuhn (*Gallus gallus domesticus*) stellt ein bedeutsames Wissenschaftsfeld dar und ist Schwerpunkt vieler Forschungsarbeiten. Insbesondere für die Geflügelindustrie ist es von großer Relevanz, durch das Verständnis des Immunsystems, die Tiergesundheit sowie die Leistungskapazität der Tiere zu erhalten und zu fördern.

Das aviäre Immunsystem unterscheidet sich in einigen Aspekten von dem der Säuger, wie dem Fehlen klassischer Lymphknoten im peripheren lymphatischen Gewebe [1]. Zudem können die Immunglobuline (Ig) IgE sowie IgD im aviären Immunsystem nicht nachgewiesen werden. Das Pendant des IgG beim Säuger wird durch IgY im Huhn dargestellt und besitzt im Gegensatz zu IgG keine Subklassen [2]. Des Weiteren weisen Vögel deutliche Unterschiede in der Komplexität der Gene des Haupt-Histokompatibilitätskomplexes (MHC) [3] und in der Generierung der Immunglobulindiversität auf [4-6]. Hervorzuheben ist außerdem der im Vergleich zum Säuger hohe Anteil an  $\gamma\delta$  T-Zellen in der Peripherie [7]. Die genaue Regulation und Funktion dieser Zellen ist noch nicht bekannt.

Zytokine sind sezernierte Proteine, welche eine Vielzahl von biologischen Aktivitäten regulieren. Sie stellen eine Schlüsselrolle in der Modulation der Immunantwort dar. Zu den Zytokinen zählen die Interleukine (IL), die Interferone (IFN), die Colony Stimulating Factors, die Transforming Growth Factors, die Tumor Necrosis Factor Superfamilie sowie die Chemokine. Das Verständnis ihrer immunmodulatorischen Aktivität im Huhn ist von großer Bedeutung, zum Beispiel für die Verbesserung von Impfungen. Die Identifizierung und Charakterisierung von homologen Zytokinmolekülen im Huhn ist jedoch schwierig. Durch den evolutionsbedingten Abstand besteht nur eine geringe Übereinstimmung der Aminosäuresequenz zu den Zytokinen der Säuger [8]. Durch fehlende Kreuzreaktivität können Antikörper und Bioassays gegen Zytokine der Säuger in der Regel nicht verwendet werden. Der hoch konservierte Transforming Growth Factor  $\beta$  konnte aufgrund homologer Gensequenzen als eines der ersten Hühnerzytokine identifiziert werden [9]. Durch das Nutzen von Expressed Sequence Tag (EST) cDNA-Bibliotheken wurden viele weitere Zytokine im Haushuhn identifiziert [10-12]. Dazu zählen auch die Mitglieder der Interleukin-17 (IL-17) Zytokinfamilie [11, 13, 14].

Die IL-17 Zytokine stehen im Fokus intensiver Forschung. Aus der Zytokinfamilie sind IL-17A und IL-17F am besten charakterisiert. Im Säuger medieren sie proinflammatorische Prozesse und spielen eine wichtige Rolle in der Wirtsabwehr, insbesondere bei einer Infektion mit extrazellulären Bakterien [15, 16], Pilzen [17] oder Parasiten [18]. Fünf homologe IL-17 Zytokine sind im Genom des Haushuhnes identifiziert [8]. Daraus wurden gallus gallus (gg) IL-17A, gg IL-17F und gg IL-17D bisher weiter untersucht [11, 13, 14]. Die genauen Funktionen und Regulationen sowie die Rezeptoren der Hühner IL-17 Zytokine sind bislang jedoch weitgehend unerforscht. Bisherige Erkenntnisse weisen auf eine vergleichbare immunregulatorische Wirkung der IL-17 Zytokine im Haushuhn hin. Die Generierung gg IL-17A- sowie gg IL-17F- spezifischer monoklonaler Antikörper stellt eine wichtige Voraussetzung dar, die immunmodulatorische Aktivität sowie die zelluläre Herkunft der IL-17 Zytokine im Haushuhn definieren zu können.

## **2 Zielsetzung**

Bisherige Methoden der zytokinspezifischen Antikörpergewinnung basieren auf der Immunisierung mit löslichen Proteinen.

Das Ziel dieser Arbeit bestand in der Etablierung einer neuartigen Methode, wobei Zytokine über einen Glykosylphosphatidylinositol (GPI)-Anker auf der Oberfläche eukaryotischer Zellen fixiert wurden. Diese Zellen wurden für die Immunisierung und das Screening der Hybridome genutzt.

Mit dieser neuartigen Immunsierungsstrategie sollten im Folgenden monoklonale Antikörper (mAK) gegen gg IL-17A und gg IL-17F generiert werden.

Schließlich sollten die generierten mAK auf ihre Spezifität sowie für ihre Verwendung in der intrazytoplasmatischen Färbung von nativen IL-17 Zytokinen getestet werden.

### **3 Literaturübersicht**

#### **3.1 IL-17 Zytokine beim Säuger**

##### **3.1.1 IL-17 Familie**

Die Familie der IL-17 Zytokine umfasst sechs Mitglieder: IL-17A, IL-17B, IL-17C, IL-17D, IL-17E (auch IL-25 genannt) und IL-17F [19-21]. Die Gensequenz für IL-17A wurde als erstes in einer cDNA-Bibliothek von Hybridomzellen muriner zytotoxischer T-Lymphozyten isoliert und danach zytotoxisches T-Lymphozyten-Antigen (CTLA-8) benannt [22, 23]. IL-17A weist eine Aminosäurehomologie von 57 % zum offenen Leserahmen (ORF) 13 des T-Zell-lymphotropen Herpes Virus Saimiri auf [24]. Die weiteren Mitglieder der IL-17 Familie konnten aufgrund homologer Sequenzen zu IL-17A identifiziert werden, sie sind in ihrer Aminosäuresequenz zu 20-50 % identisch mit IL-17A [25]. Die IL-17 Zytokine zeigen keine Übereinstimmung mit der Gensequenz anderer bekannter Säugerproteine und repräsentieren eine abgegrenzte Zytokinfamilie [21]. Sie konnten in allen bis jetzt untersuchten Wirbeltieren isoliert werden [21]. In Zebrafischen wurden sieben und im Meerneunauge fünf homologe Gensequenzen zu Säuger IL-17 Zytokinen identifiziert. Es handelt sich demnach um hoch konservierte Zytokine, welche sehr früh in der Evolution aufgetreten sind [26, 27]. Die IL-17 Zytokine von Mensch und Maus sind zu 62-88 % homolog [20]. Innerhalb der IL-17 Zytokine besitzen IL-17A und IL-17F die höchste Homologie mit einer Übereinstimmung von 50 % der Aminosäuresequenz [20]. Sie sind in allen Spezies eng miteinander verknüpft und auf dem gleichen Chromosom in syntenischen Genregionen kodiert (Mensch: Chromosom 6, Maus: Chromosom 1, Ratte: Chromosom 9) [19, 20]. Ihre biologische Aktivität und Regulation ist von allen IL-17 Zytokinen am besten untersucht. Sie besitzen aufgrund ihrer proinflammatorischen und immunregulatorischen Wirkung einen wichtigen Stellenwert innerhalb der IL-17 Zytokine. Die restlichen IL-17 Familienmitglieder weisen eine geringere Homologie von 16-30 % zu IL-17A auf und werden auf unterschiedlichen Chromosomen kodiert [20]. IL-17E (IL-25) besitzt mit 16 % die geringste Übereinstimmung zu IL-17A [21] und nimmt durch seine Beteiligung an einer T-Helferzell-2-medierten Immunantwort eine Sonderstellung innerhalb der IL-17 Familie ein [28]. IL-17B, IL-17C und IL-17D weisen ebenfalls proinflammatorische Effekte auf. Sie sind jedoch weitgehend unerforscht [29, 30].

### 3.1.2 Struktur der IL-17 Zytokine

IL-17 Zytokine werden als dimere Proteine gebildet. Sie repräsentieren strukturelle Homologe zu den Proteinen mit einem Zysteinknoten [20, 31]. Dieses strukturelle Motiv ist sehr stabil und tritt in vielen Proteinen auf. Dazu zählen die Wachstumsfaktoren, wie der Transforming Growth Factor  $\beta$  (TGF- $\beta$ ), der Nervenwachstumsfaktor- $\beta$ , der Platelet-Derived-Growth-Factor-BB, das humane Choriongonadotropin oder die Knochenmorphogenetischen Proteine [32, 33]. In diesen Proteinen besteht der Zysteinknoten aus sechs Zysteinresten, welche drei Disulfidbrücken ausbilden. Die Struktur des Zysteinknotens in den IL-17 Zytokinen wurde in IL-17F charakterisiert [31, 34]. Die Aminosäuresequenzen der IL-17 Zytokine weisen sechs Zysteinreste auf. Vier dieser Zysteinreste sind zwischen allen Familienmitgliedern der bisher untersuchten Spezies hoch konserviert. Im Gegensatz zu den Wachstumsfaktoren wird der Zysteinknoten in den IL-17 Zytokinen nicht aus sechs, sondern aus diesen vier Zysteinresten gebildet, welche zwei Disulfidbrücken ausbilden [31]. Eine Ausnahme bildet das IL-17B, das zwar ebenfalls die vier Zysteinreste aufweist, aber als eng assoziiertes nicht-kovalentes Dimer ohne Disulfidbrücken freigesetzt wird [35]. IL-17A und IL-17F können als Homodimere oder als IL-17A/IL-17F-Heterodimere [36, 37] nachgewiesen werden [23, 38]. Für die restlichen IL-17 Zytokine sind bisher keine heterodimeren Formen bekannt.

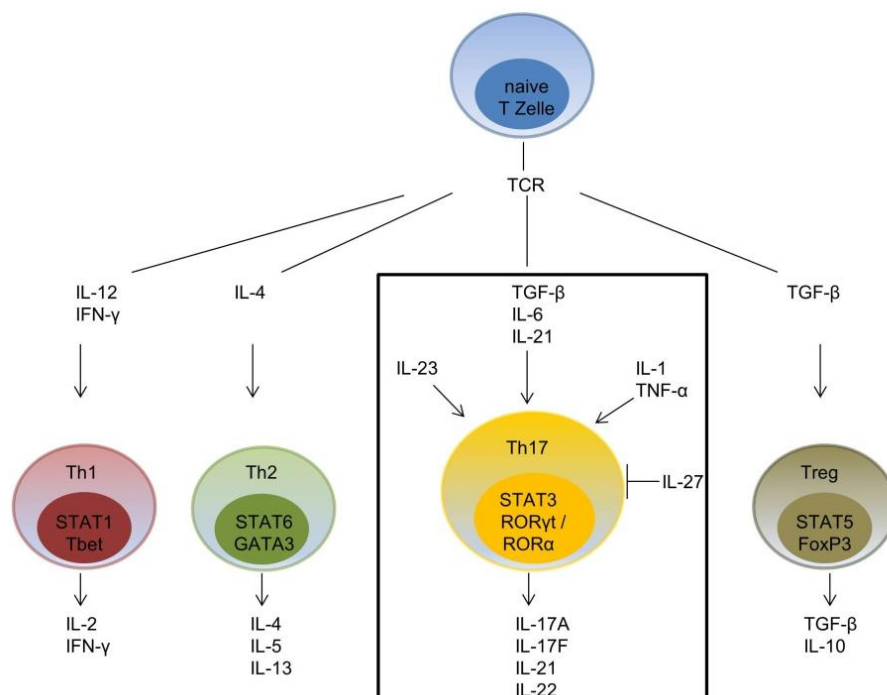
### 3.1.3 Bildung der IL-17 Zytokine

#### 3.1.3.1 IL-17A, IL-17F

Die aktivierten T-Lymphozyten, insbesondere die Th17-Zellen, stellen in der adaptiven Immunantwort die wichtigste Quelle des IL-17A und IL-17F dar [19, 39]. In den letzten Jahren wurde gezeigt, dass beide Zytokine ebenfalls durch eine Vielzahl von Zellen des angeborenen Immunsystems gebildet werden und somit sehr früh während einer Immunantwort wirken.

Die  $CD4^+ \alpha\beta$  Th17-Zellen stellen neben den Th1- und Th2-Zellen eine abgegrenzte Gruppe der T-Helferzellen (Th) dar [40, 41] (Abbildung 1, Seite 7). Sie sind als  $CD3^+$ ,  $CD4^+$ ,  $CD8^-$ ,  $CD45RB^{low}$ ,  $CD44^{high}$  und  $CD62L^{low}$  charakterisiert und hauptsächlich in mukosalem Barrieregewebe, wie der Lamina propria des Darmes, lokalisiert [42]. Neben IL-17A, IL-17F gehören IL-21 und IL-22 zu ihren Effektormolekülen. Die Differenzierung der Th17-Zellen wird durch IL-6 und TGF- $\beta$  induziert [43-45]. Aufrechterhalten und amplifiziert wird die Th17-Reaktion durch IL-1 und IL-23 [46, 47]. TGF- $\beta$  induziert ohne inflammatorische Umgebung die Expression von Forkhead-Box-Protein P3 (FoxP3) [48, 49], ein essentieller Transkriptionsfaktor der regulatorischen  $CD4^+ CD25^+$  T-Zellen (Treg) [45, 50-52]. Im Falle eines Entzündungsgeschehens stimuliert IL-6 mit TGF- $\beta$  die Expression der Transkriptionsfaktoren Retinoid-Related Orphan Receptor  $\gamma$ t (ROR $\gamma$ t) [53] sowie ROR $\alpha$  und somit die Ausdifferenzierung von Th17-Zellen [21, 45, 46] (Abbildung 1, Seite 7). IL-6 stimuliert die Aktivierung des Signal Transducer and Activator of Transcription 3 (STAT3) [54]. Dieser bindet direkt an den IL-17 Promotor und induziert die Expression des ROR $\gamma$ t und ROR $\alpha$ . IL-6 stimuliert über STAT3 zudem die Expression des IL-1-Rezeptors (IL-1R) [55]. IL-1 erhöht die Expression von ROR $\gamma$ t und ist für die Aufrechterhaltung der IL-17-Sekretion in der frühen Phase von Bedeutung. Die Differenzierung der Th17-Zellen wird durch den Tumor Necrosis Factor  $\alpha$  (TNF- $\alpha$ ) weiter verstärkt [46]. Neben IL-6 wird eine Aktivierung von Th17-Zellen durch TGF- $\beta$  zusammen mit IL-21 induziert. IL-21 wird durch aktivierte Th1-, Th2- und vor allem Th17-Zellen selbst freigesetzt und wirkt als autokriner Verstärker der Th17-Antwort [56]. Die Expression von IL-21 wird durch die Aktivierung des T-Zellrezeptors (TCR) und IL-6 stimuliert [56]. IL-23 stimuliert reife  $CD4^+$  Th17-Zellen für die Produktion von IL-17A und IL-17F [45, 47]. Die Expression des induzierbaren Anteils des IL-23-Rezeptors (IL-23R) erfolgt nach Aktivierung durch TGF- $\beta$  und IL-6 oder IL-21 [43, 44] sowie IL-1 [55]. Des Weiteren aktiviert IL-23 über STAT4 [57] die Expression der Liganden bindenden Untereinheit  $\alpha$  des IL-18-Rezeptors. Vergleichbar zu Th1-Zellen, ist

eine Amplifikation der Th17-Antwort über IL-18 wahrscheinlich [21]. IL-27 hemmt die Th17-Antwort [58]. Es aktiviert, wie IFN- $\gamma$ , STAT1, was den Suppressor of Cytokine Signaling 3 (SOCS3) induziert. SOCS3 hemmt die Phosphorylierung von STAT3 [59]. IL-27 wirkt potenter und unabhängig von IFN- $\gamma$  auf Th17-Zellen [58]. Zudem besteht der IL-27-Rezeptor aus dem IL-27R $\alpha$  und dem Glykoprotein gp130 [21]. Gp 130 ist ebenfalls Untereinheit der IL-6-Rezeptoren. IL-27 und IL-6 wirken, durch kompetitive Hemmung für gp130, antagonistisch auf naive T-Zellen. Die Th1- und Th2- typischen Zytokine IFN- $\gamma$  und IL-4 besitzen ebenfalls einen inhibitorischen Effekt auf die Entwicklung der Th17-Zellen [40, 60].



**Abbildung 1: Differenzierungswege naiver CD4<sup>+</sup> T- Zellen**

Die Entwicklung der CD4<sup>+</sup> Effektor-T-Zellen Th1, Th2, Th17 und Treg durch die Aktivierung des TCR und ihrer stimulierenden Zytokine ist dargestellt. Der hemmende Effekt von IL-27 auf Th17 ist durch einen senkrechten Strich verdeutlicht. In den Zellen werden die zellspezifischen Transkriptionsfaktoren gezeigt. Die von den aktivierten T-Zellen gebildeten Effektormoleküle sind unterhalb der jeweiligen Zellpopulation aufgeführt. Th9 und folliculäre Th sind in der Abbildung nicht berücksichtigt.

Neben den klassischen CD4<sup>+</sup>  $\alpha\beta$  Th17-Zellen, ist die Expression von IL-17F in aktivierten CD4<sup>+</sup>  $\alpha\beta$  Th2-Zellen nachgewiesen [61].

Zudem kann eine definierte Population nicht-zytotoxischer CD8<sup>+</sup>-T-Zellen nach Aktivierung IL-17A bilden [62]. Die Kombination aus IL-6 und TGF- $\beta$  stimuliert die Expression von ROR $\gamma$ t. Dies lässt auf eine vergleichbare Regulation der IL-17-Transkription wie in den Th17-Zellen schließen [62].



Eine bedeutsame IL-17A- und IL-17F- produzierende Zellpopulation stellen die  $\gamma\delta$  T-Zellen dar. Bei Maus und Mensch umfasst der Anteil der  $\gamma\delta$  T-Zellen nur 1-5 % der gesamten Lymphozyten [63]. Durch die Expression von Toll-ähnlichen Rezeptoren (TLR) weisen sie Charakteristika des angeborenen Immunsystems auf [64]. Sie sind damit für die erste Immunabwehr von Bedeutung und insbesondere an der Schleimhautbarriere des Darmes, der Lunge oder der Haut lokalisiert [39]. In den ersten Phasen einer Infektion, noch bevor es zu einer antigenspezifischen Aktivierung der  $CD4^+ \alpha\beta$  T-Zellen kommt, stellen  $\gamma\delta$  T-Zellen eine wichtige IL-17A- und IL-17F- produzierende Zellpopulation dar [65, 66]. Sie können IL-17 Zytokine innerhalb der ersten 24 h ohne Antigenkontakt freisetzen [67]. Stark et al. charakterisierten die IL-17- bildenden  $\gamma\delta$  T-Zellen als  $CD3^+, CD4^-, CD8^-, CD45RB^{low}, CD44^{high}$  und  $CD62L^{low}$  [42], wodurch sie Charakteristika von ausdifferenzierten Effektor-Gedächtniszellen aufweisen [68]. Die untersuchten IL-17-positiven Zellen weisen einen TCR V $\gamma$ 4 oder TCR V $\gamma$ 6 auf [66, 68]. IFN- $\gamma^+$  V $\gamma$ 1  $\gamma\delta$  T-Zellen und IL-17 $^+$   $\gamma\delta$  T-Zellen stellen unterschiedliche Zellpopulationen dar [68], welche durch die Expression von CD27 [69] und dem Chemokinrezeptor 6 (CCR6) unterschieden werden können. Im Selektionsprozess des Thymus wird festgelegt, ob sich die  $\gamma\delta$  T-Zellen in  $CD27^+, CCR6^-, CD44^{low}, CD62L^{high}, IFN-\gamma^+$  oder in  $CD27^-, CCR6^+, CD44^{high}, CD62L^{low}, IL-17^+$  Zellen entwickeln [64, 69]. Eine kleine Zellpopulation IL-17-/IFN- $\gamma$ -doppelt positiver  $\gamma\delta$  T-Zellen wurde auch nachgewiesen [66].  $\gamma\delta$  T-Zellen benötigen im Vergleich zu den  $\alpha\beta$  T-Zellen keine aktivierenden Mechanismen aus TCR und IL-6, IL-21 und TGF- $\beta$  [69], sie exprimieren konstitutiv den IL-23R, den IL-1R und ROR $\gamma$ t [53]. Die IL-17-Produktion der  $\gamma\delta$  T-Zellen kann allein durch IL-1 oder IL-23 [65, 66] oder die Aktivierung der TLRs [67] stimuliert werden.

Die Zellen des angeborenen Immunsystems sind, neben den  $\gamma\delta$  T-Zellen, für eine schnelle Freisetzung der IL-17 Zytokine von Bedeutung.

Natürliche Killer-T-Zellen (NKT) produzieren IL-17A innerhalb der ersten 24 h nach einer Infektion [70]. Sie befinden sich in den peripheren lymphatischen Organen [71]. NKT exprimieren einen TCR für die Erkennung von Glykolipiden auf dem MHC-ähnlichen CD1 sowie Natürliche Killerzell (NK)-Marker. IL-17 $^+$  NKT sind NK1.1 $^+$ . Sie exprimieren konstitutiv den IL-23R, den IL-1R und ROR $\gamma$ t [70]. Die Expression von IL-17A erfolgt durch eine Aktivierung mit IL-23 oder IL-1 und der Stimulation des TCR.

Eine schnelle Freisetzung von IL-17A erfolgt aus aktivierten neutrophilen Granulozyten [72]. Li et al. zeigten, dass neutrophile Granulozyten die Hauptquelle von IL-17A während eines ischämischen Reperfusionssyndroms der Niere darstellen [73]. IL-17F kann in basophilen Granulozyten nachgewiesen werden [61]. Es ist nicht bekannt, ob die Granulozyten einen IL-23R oder ROR $\gamma$ t exprimieren [74].

Die insbesondere in mukosalen Barrieren des Darmes lokalisierten Innate Lymphoid Cells (ILCs) werden entsprechend ihrer Zytokinexpression und ihrer Transkriptionsfaktoren in ILC1, ILC2 und ILC3 eingeteilt. ILC3 exprimieren ROR $\gamma$ t und sezernieren nach Stimulation mit IL-23 und IL-1 IL-17A und IL-17F [75, 76]. Zu den ILC3 zählen ebenfalls die Lymphoid Tissue inducer-like cells (LTi-like cells). Sie unterscheiden sich durch ihre Expression von Molekülen, wie Lymphotoxin- $\alpha$  (LT- $\alpha$ ) oder LT- $\beta$ , für die Organisation des lymphatischen Gewebes. Takatori et al. identifizierten LTi-like cells in der Milz, welche konstitutiv ROR $\gamma$ t und den IL-23R exprimieren. Nach Stimulation mit IL-23 bilden sie IL-17A, IL-17F und IL-22 [77].

Mastzellen produzieren IL-17A und IL-17F infolge verschiedener inflammatorischer Stimuli, wie TNF- $\alpha$ , Lipopolysacchariden, IgG-Komplexen oder dem Komplementfaktor C5A [78].

Zusätzlich zu den Zellen des Immunsystems setzen Epithelzellen in proinflammatorischen Prozessen eine Vielzahl von Zytokinen frei. In Epithelzellen des Darmes [16] und der Lunge [79] ist eine Expression von IL-17F nachgewiesen. Beide IL-17 Zytokine induzieren eine weitere Stimulation der Epithelzellen [76].

Paneth-Körnerzellen sind spezialisierte Epithelzellen am Boden der Lieberkühndrüsen und zählen durch ihre Expression von Pattern Recognition Receptors (PRR) und der Sekretion antimikrobieller Peptide aus ihren Granula zum angeborenen Immunsystem [80]. Die Expression von IL-17A ist konstitutiv nachweisbar. TNF- $\alpha$  stimuliert eine schnelle Freisetzung von IL-17A aus den Granula der Paneth-Zellen [81].

### 3.1.3.2 IL-17B, IL-17C, IL-17D, IL-17E (IL-25)

IL-17B und IL-17C können nicht in Lymphozyten nachgewiesen werden [29]. IL-17C wird nach Aktivierung der TLRs oder Stimulation mit TNF- $\alpha$  und IL-1 aus Epithelzellen freigesetzt [76, 82]. Eine hohe Expression von IL-17C ist in Epithelzellen der Haut, des Darmes und der Lunge nach Infektion mit *Staphylococcus aureus* (*S. aureus*), *Escherichia coli*, *Citrobacter rodentium* (*C. rodentium*) beziehungsweise *Mycoplasma pneumoniae* nachweisbar [82].

Die mRNA des IL-17B ist in vielen Organen, wie Hoden, Dünndarm, Magen oder Pankreas und zu geringen Mengen in Prostata, Ovar, Uterus oder Dickdarm, nachweisbar [29, 35]. Die höchste Expression von IL-17B ist in Chondrozyten und Neuronen detektierbar [35, 83].

Eine Expression von IL-17D kann ebenfalls in vielen Geweben, wie der Skelettmuskulatur, dem Fettgewebe, der Lunge, dem Herzen, dem Gehirn und dem Pankreas, nachgewiesen werden. Geringe Mengen sind in ruhenden CD4<sup>+</sup> T-Zellen oder CD19<sup>+</sup> B-Zellen detektierbar [30]. In aktivierten CD4<sup>+</sup> T-Zellen oder CD19<sup>+</sup> B-Zellen sowie in CD8<sup>+</sup> T-Zellen ist es nicht nachweisbar [30].

IL-17E ist auf mRNA-Ebene insbesondere im mukosalen Gewebe des Gastrointestinaltraktes und des Uterus hoch exprimiert [84]. Es wird durch Th2-Zellen [84] sowie aktivierte Mastzellen [85] gebildet. IL-17E mRNA wurde ebenfalls in eosinophilen Granulozyten, basophilen Granulozyten, Alveolarmakrophagen, Mikrogliazellen, Epithelzellen und Endothelzellen nachgewiesen [64].

### 3.1.4 Rezeptoren der IL-17 Zytokine

Die Familie der IL-17-Rezeptoren (IL-17R) umfasst fünf Mitglieder: IL-17RA, IL-17RB, IL-17RC, IL-17RD und IL-17RE [19]. Sie repräsentieren eine eigene, abgegrenzte Familie der Zytokinrezeptoren [19, 21]. Die Gene der Rezeptoren sind hochkonserviert mit einer Homologie von 68-90 % zwischen humanen und murinen IL-17 Rezeptoren [20]. Es sind sechs Homologe des IL-17 Rezeptors im Genom des Meerneunauges und drei im Genom des Zebrafisches nachgewiesen [26, 27]. Die Rezeptoren bestehen aus einer extrazellulären Fibronectin III-ähnlichen Domäne, einem transmembranösen Anteil und einer langen intrazellulären Domäne [21]. Intrazytoplasmatisch weisen alle Rezeptoren eine gemeinsame Subdomäne, die so genannte Similar Expression to Fibroblast Growth Factor Genes and IL-17R (SEFIR), auf [86] (Abbildung 2, Seite 13). Diese besitzt konservierte Sequenzmotive der Toll-ähnliche/IL-1R-Domäne (TIR). Die Signalwege der Rezeptoren sind für den IL-17RA genau untersucht. SEFIR interagiert intrazellulär mit der E3 Ubiquitinligase Act1 [87]. Act1 vermittelt die Bindung und Ubiquitylierung des Tumor Necrosis Factor Receptor associated Factor 6 (TRAF 6) sowie die Rekrutierung der TGF- $\beta$  aktivierten Kinase 1 (TAK1) [88, 89]. Dies induziert die Aktivierung der Signalwege des Nuclear Factor kappa B (NF- $\kappa$ B) und der Mitogen aktivierten Kinasen (MAPK) p38, ERK1, ERK2 und c-JNK [90, 91]. Die Aktivierung der MAPK induziert die Aktivierung des Aktivator-Protein 1 (AP-1). Zudem werden die Transkriptionsfaktoren CCAAT/Enhancer-Binding-Protein  $\beta$  (C/EBP $\beta$ ) und C/EBP $\delta$  aktiviert [92]. Letztlich führt dies zur Expression von proinflammatorischen Zytokinen und Chemokinen, wie IL-6 [20]. Die MAPK-Signalwege sind weniger für die direkte Aktivierung der IL-17 induzierten Genexpression, als vielmehr in der Regulierung dieser Genexpression durch die Kontrolle der mRNA-Stabilität wichtig. MAPK stabilisieren die mRNA durch Hemmung von Destabilisierungs-Proteinen, welche AU-reiche Regionen im mRNA-Transkriptom binden und den Abbau induzieren [93]. Im Falle von IL-17RA reicht die SEFIR-Subdomäne für eine intrazelluläre Weiterleitung der Aktivierung nicht aus. Der Rezeptor benötigt ein weiteres kurzes Motiv am C-terminalen Ende der SEFIR-Domäne, die TIR-like loop (TILL). Diese besitzt homologe Strukturen der TIR-Domäne, genannt BB loop [93]. Mögliche Signalmoleküle für die Interaktion mit TILL sind nicht bekannt. Die Tatsache, dass TILL nur in IL-17RA identifiziert wurde, kann die Beteiligung des IL-17RA an den bis jetzt bekannten heterodimeren IL-17-Rezeptorkomplexen erklären. Die intrazellulären Signalwege der weiteren IL-17-Rezeptoren sind nur in Teilen untersucht.

Die IL-17-Rezeptoren bilden dimere Rezeptorkomplexe. Jedes IL-17 Zytokin bindet an einen spezifischen Rezeptorkomplex [94] (Abbildung 2, Seite 13). Wie die Rezeptoren miteinander interagieren, um funktionsfähige Komplexe zu bilden und wie sie in der Zelle vorliegen, ist noch nicht bekannt.

Mit der Ausnahme von IL-17RA weisen alle Rezeptoren alternative Splicevarianten auf [95, 96]. Dies führt zu einer Verschiebung des Leserahmens und zu der Entstehung von Stopcodons. Es entstehen lösliche Proteine, welche keine transmembranöse oder intrazytoplasmatische Domäne besitzen und IL-17 möglicherweise abfangen können [20]. Die biologische Funktion der löslichen IL-17-Rezeptorvarianten ist noch nicht weiter untersucht.

#### **3.1.4.1 IL-17RA, IL-17RC**

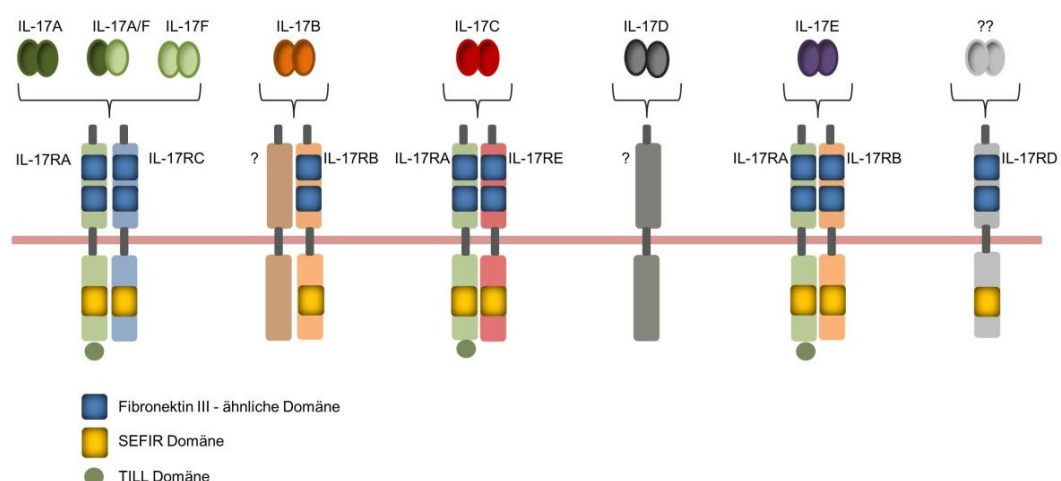
Der Rezeptorkomplex aus IL-17RA und IL-17RC bindet IL-17A, IL-17F sowie das IL-17A/IL-17F-Heterodimer [97, 98]. Die Rezeptoruntereinheiten weisen Unterschiede in ihrer Verteilung und Affinität auf. IL-17RA besitzt eine hundertfach höhere Affinität für IL-17A als für IL-17F [31]. Die Affinität für das IL-17A/IL-17F-Heterodimer liegt zwischen IL-17A und IL-17F [99]. Der humane IL-17RC bindet humanes IL-17C mit höherer Affinität als IL-17A, während der murine IL-17RC nur mit murinem IL-17F und nicht mit IL-17A interagiert [93, 97]. Ohne die IL-17RC-Rezeptoreinheit bindet IL-17A zwar an IL-17RA, jedoch mit geringer Affinität. IL-17RA ist ubiquitär exprimiert, insbesondere auf haematopoetischen Zellen wie B-Zellen, T-Zellen, Makrophagen und neutrophilen Granulozyten, aber auch auf nicht-haematopoetischen Zellen, wie Osteoblasten, Chondrozyten, Fibroblasten, Endothelzellen und Epithelzellen. IL-17RC ist auf nicht-haematopoetischen Zellen hochexprimiert und nur in geringen Mengen auf haematopoetischen Zellen nachweisbar [16, 97]. Dies erklärt die primäre Rolle der IL-17A und IL-17F Zytokine auf nicht-haematopoetische Zellen, während die Wirkung auf haematopoetische Zellen limitiert ist. Ob IL-17RA als homodimerer Komplex auf haematopoetischen Zellen vorliegt oder einen Komplex mit einem unbekannten Molekül eingeht, ist nicht bekannt. Es ist noch nicht untersucht, wie IL-17RA und IL-17RC vor Bindung der Liganden in der Zelle organisiert sind. Bis jetzt gibt es keinen Hinweis auf präformierte Komplexe aus IL-17RA und IL-17RC [92].

### 3.1.4.2 IL-17RB, IL-17RD, IL-17RE

Der IL-17RB kann auf RNA-Basis in endokrinem Gewebe, Leber, Niere, Pankreas, Hoden, Dünn- und Dickdarm nachgewiesen werden [35]. Zudem ist die Expression des IL-17RB in Th2-Zellen, Th9-Zellen, naiven CD4<sup>+</sup> T-Zellen, in NKT-Zellen, sowie den IL-17E-sensitiven Nicht-B-Zell/Nicht-T Zell CD117<sup>+</sup>-Zellen detektierbar [92]. IL-17RB bindet IL-17B [35]. Es ist nicht bekannt, ob IL-17RB hierfür ebenfalls einen dimeren Komplex bildet. Die intrazellulären Signalwege der IL-17B Aktivierung sind noch nicht erforscht. Der Rezeptorkomplex aus IL-17RB und IL-17RA bindet IL-17E [100]. IL-17E stimuliert, TRAF6 abhängig, NF- $\kappa$ B sowie die Signalwege der MAPKs [92]. Im Gegensatz zu IL-17RA weist IL-17RB ein TRAF6-bindendes Motiv in der intrazytoplasmatischen Domäne auf [93]. Die Bindung von TRAF6 an die intrazelluläre IL-17RB Domäne aktiviert ebenfalls NF- $\kappa$ B [83].

Die Expression von IL-17RD ist in Endothelzellen, Epithelzellen und im Muskelgewebe nachgewiesen [83]. Rong et al. zeigten, dass IL-17RD mit IL-17RA interagieren kann [101]. Zudem kann IL-17RD Homodimere bilden [93]. Der Ligand sowie die biologische Bedeutung des IL-17RD sind noch nicht bekannt.

IL-17RE bindet als Komplex mit IL-17RA, IL-17C. Dies aktiviert intrazellulär NF- $\kappa$ B [83]. Die höchste Expression des IL-17RE wird im mukosalem Gewebe des Darmes und der Lunge nachgewiesen [82]. Der Rezeptor für IL-17D ist noch nicht identifiziert.



#### Abbildung 2: IL-17-Rezeptoren

Die Bindung der IL-17 Zytokine an ihre Rezeptorkomplexe ist dargestellt. IL-17A, IL-17F und das IL-17A/IL-17F-Heterodimer binden an den IL-17RA/IL-17RC-Komplex. Eine Bindung von IL-17B an IL-17RB ist nachgewiesen. IL-17C bindet an den Rezeptorkomplex IL-17RA/IL-17RE. Der Komplex aus IL-17RA /IL-17RB bindet IL-17E. Der Rezeptor für IL-17D sowie der Ligand von IL-17RD sind noch nicht identifiziert.

### 3.1.5 Funktion der IL-17 Zytokine

#### 3.1.5.1 IL-17A, IL-17F

Die biologischen Effekte von IL-17A und IL-17F sind am besten untersucht. Sie weisen proinflammatorische Effekte auf eine Vielzahl von verschiedenen Zelltypen, wie Epithelzellen, Endothelzellen, Fibroblasten, Osteoblasten, Chondrozyten und Monozyten [16, 102], auf. IL-17A und IL-17F induzieren die Expression von proinflammatorischen Zytokinen, wie IL-1 $\beta$ , IL-6, IL-8, TNF- $\alpha$  [23, 103], und Chemokinen, wie CXCL1, CXCL6, CCL2, CCL7, CCL20 [40]. Sie steigern die Aktivierung und Rekrutierung von neutrophilen Granulozyten [104]. Durch die Expression des Granulozyten-Kolonie-stimulierenden Faktors (G-CSF) und des Granulozyten- Makrophagen-Kolonie-stimulierenden Faktors (GM-CSF) induzieren sie die Granulopoese [39, 105, 106]. Zudem stimulieren IL-17A und IL-17F die Bildung von antimikrobiellen Proteinen, wie  $\beta$ -Defensin und Muzin [107, 108] sowie der Matrix-Metalloproteinasen MMP3 und MMP13 [40]. TNF- $\alpha$  weist einen synergistisch proinflammatorischen Effekt mit IL-17A auf [109]. IL-17F ist in seiner biologischen Aktivität weniger potent als IL-17A. Das IL-17A/IL-17F-Heterodimer besitzt einen intermediär stimulierenden Effekt [37, 102].

In experimentellen Krankheitsmodellen wurde nachgewiesen, dass IL-17A und IL-17F überlappende, aber nicht immer identische, Effekte aufweisen. Ishigami et al. demonstrierten, dass IL-17A in der Entwicklung der experimentellen autoimmunen Enzephalomyelitis oder der Kollagen-induzierten Arthritis eine ausschlaggebende, IL-17F nur eine marginale Rolle spielt [16]. In einer durch Dextran-sulfat-induzierten Kolitis verstärkt IL-17F im Gegensatz zu IL-17A den Entzündungsvorgang [102]. In den Zellen der bronchoalveolären Lavage von Asthmatikern ist die Expression von IL-17F und nicht von IL-17A erhöht, was durch die Expression des Zytokins in aktivierten Mastzellen, Th2-Zellen und basophilen Granulozyten auf eine Beteiligung des IL-17F in der Pathogenese von Asthma schließen lässt [61]. Für IL-17A ist ein stimulierender Effekt auf die Synthese des Tight junction-Proteins Claudin nachgewiesen, wodurch es effektiv zur Aufrechterhaltung der mukosalen Barriere [76] beiträgt. Zudem wirkt IL-17A aufgrund der Expression des IL-17RA auf haematopoetischen Zellen. Es hemmt die Differenzierung von Th1-Zellen. Des Weiteren wirkt es chemotaktisch auf B-Zellen und synergistisch mit dem B-Zell-aktivierenden Faktor BAFF auf das Überleben und die Proliferation von B-Zellen [92].

### 3.1.5.2 IL-17B, IL-17C, IL-17D

IL-17B und IL-17C stimulieren die Freisetzung von TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$  durch die Makrophagen-Zelllinie THP-1 [29]. IL-17C wirkt direkt stimulierend auf die Th17-Zellen [110]. Die genauen Mechanismen dieser Stimulation sind noch unerforscht. IL-17C besitzt einen proinflammatorischen Effekt auf Epithelzellen, insbesondere die des Darmes [111]. Es stimuliert, wie IL-17A und IL-17F, die Freisetzung des G-CSF sowie antimikrobieller Peptide, wie  $\beta$ -Defensin und verstärkt die Chemotaxis von Neutrophilen [82]. TNF- $\alpha$  und IL-1 $\beta$  wirken synergistisch mit IL-17C [82]. IL-17D stimuliert die Expression von IL-6, IL-8 und des GM-CSF aus Endothelzellen [30].

### 3.1.5.3 IL-17E (IL-25)

IL-17E unterscheidet sich in seiner Funktion deutlich von dem Rest der Zytokinfamilie. IL-17E induziert die Expression von Th2-typischen Zytokinen IL-4, IL-5 und IL-13 sowie CCL5 und CCL11 [28, 84, 112]. Damit spielt es eine wichtige Rolle bei der Rekrutierung von eosinophilen und basophilen Granulozyten und führt zu der Ausprägung allergischer Reaktionen vom Typ 2. Dazu gehört ein erhöhter Spiegel an IgE, IgG, IgA sowie eine intestinale und pulmonale epitheliale Hyperplasie, Becherzellhypertrophie und Schleimsekretion [21, 84]. IL-17E führt zu einer sehr frühen Ausschüttung von Typ 2 Zytokinen und spielt damit eine wichtige Rolle in der Wirtsabwehr von Parasiten sowie während allergischer Reaktionen [28]. Eine IL-17E-Defizienz führt zu einer reduzierten Induktion von Typ 2 Zytokinen, aber auch zu einer verstärkten Expression des Typ 1 Zytokins IFN- $\gamma$  [21]. Die IL-17E-sensitiven Zellen sind nicht alle charakterisiert. Hauptsächlich handelt es sich um Zellen des angeborenen Immunsystems, welche keine T-Zell- oder B-Zell-Marker sowie keine Granulozyten- oder Makrophagenmarker, jedoch MHC Proteinen der Klasse II aufweisen [112]. Sie sind als Nicht-B-Zell-Nicht-T-Zell CD19 $^-$ , CD3 $^-$ , CD4 $^-$ , CD8 $^-$ , CD117 $^+$  und Fc $\epsilon$ -Rezeptor $^-$  charakterisiert [28, 84, 112]. Außerdem wirkt IL-17E stimulierend auf Th2-Gedächtniszellen sowie naive CD4 $^+$  T-Zellen in der Differenzierung zu Th2-Zellen, was die Th2-Antwort weiter verstärkt. Des Weiteren kann IL-17E die Expression von IL-13, CCL17 und CCL22 in NKT-Zellen induzieren [92]. Neben der Th2-stimulierenden Wirkung ist ein Effekt auf Th9-Zellen nachgewiesen. IL-17E erhöht die Expression von IL-9 [113].



### 3.1.6 Bedeutung von IL-17A und IL-17F in der Wirtsabwehr

Insbesondere an den mukosalen Barrieren spielen die IL-17A und IL-17F Zytokine eine bedeutsame Rolle in der Immunabwehr. Sie sind wichtig für die Beseitigung extrazellulärer Bakterien, wie *S. aureus*, *Klebsiella pneumoniae* oder *C. rodentium* [39]. Cho et al. zeigten, dass IL-17A und IL-17F aus dermalen  $\gamma\delta$  T-Zellen ausschlaggebend für eine effektive Immunantwort bei epidermaler Infektion mit *S. aureus* sind. Defekte in der Expression von IL-17A und IL-17F führen zu größeren Hautschäden, höheren bakteriellen Besiedlungen und einer verminderten Rekrutierung von neutrophilen Granulozyten [15]. IL-17A und IL-17F induzieren eine protektive Immunantwort bei ephitelialen Infektionen, während kein Einfluss bei systemischen Infektionen mit *S. aureus* nachgewiesen werden kann [16]. Im Darm unterstützen IL-17A und IL-17F durch die Stimulation der Expression von antibakteriellen Proteinen die Immunantwort bei einer Infektion mit *C. rodentium* [16]. IL-17A und IL-17F verstärken zudem die Immunantwort gegen *Mycobacterium tuberculosis* nach wiederholtem Antigenkontakt [114]. Im Gegensatz zu einer Infektion mit extrazellulären Bakterien, ist die Wirkung von IL-17A und IL-17F nicht bei einer ersten Infektion mit *Mycobacterium tuberculosis* von Bedeutung [25].

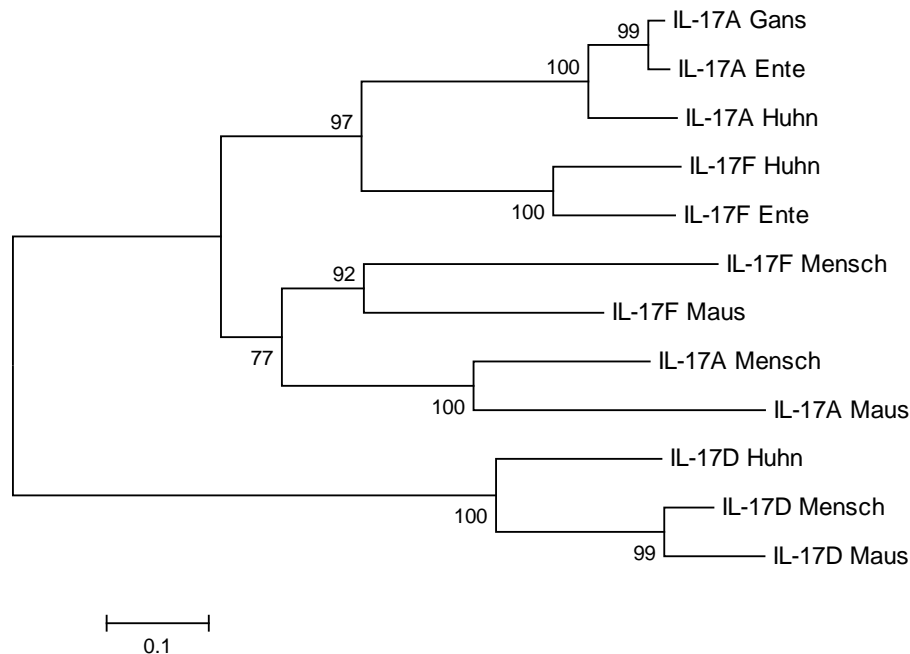
In der Abwehr von Pilzinfektionen unterstützt IL-17A die Immunantwort. Eine Neutralisation des Zytokins führt zu einer deutlich stärkeren Ausbreitung von *Candida albicans* oder *Pneumocystis carini* sowie einer verminderten Aktivierung der Neutrophilen [17, 115].

Die Rolle von IL-17A und IL-17F in parasitären Infektionen wird kontrovers diskutiert. Immunstimulierende Effekte von IL-17A und IL-17F bei Infektionen mit *Trypanosoma cruzi* [116] oder *Toxoplasma gondii* [18] sind nachgewiesen. In IL-17A<sup>-/-</sup> Mäusen ist die Überlebensrate bei einer Infektion mit *Trypanosoma cruzi* stark vermindert und die parasitäre Besiedlung in Leber, Niere und Herz erhöht. Kelly et al. zeigten, dass die Deletion des IL-17R zu einer deutlich erhöhten parasitären Besiedlung mit *Toxoplasma gondii* sowie einer verminderten Migration von neutrophilen Granulozyten führt. Guiton et al. stellten allerdings heraus, dass IL-17 den Krankheitsverlauf von *Toxoplasma gondii* [117] verstärkt. Die Verabreichung von IL-17A-neutralisierenden Antikörpern führt in untersuchten Mäusen zu einer verminderten Gewebeschädigung sowie einer verlängerten Lebensdauer [117]. Vergleichbar ist in IL-17A-defizienten Mäusen nach einer Infektion mit *Leishmania major* eine geringere Hautschädigung feststellbar [118].

## 3.2 IL-17 beim Haushuhn

### 3.2.1 Gallus gallus (gg) IL-17 Familie

Von den sechs IL-17 Zytokinen der Säuger wurden bisher fünf Mitglieder der Zytokinfamilie im Genom des Haushuhnes identifiziert: gg IL-17A, gg IL-17B, gg IL-17C (NCBI: XM\_003641945.3), gg IL-17F und gg IL-17D [8]. Gg IL-17A, gg IL-17D und gg IL-17F sind am besten charakterisiert. Ein Homolog des IL-17B und des IL-17C der Säuger ist auf Chromosom 13 beziehungsweise Chromosom 11 im Hühnergenom kodiert [8]. Der Nachweis eines homologen IL-17E im Haushuhn ist bis jetzt nicht erbracht. Die Aminosäuresequenzen der untersuchten IL-17 Zytokine des Haushuhnes sind zu 37-76 % homolog zu den Sequenzen der Säuger. Basierend auf den homologen Gensequenzen wurde gg IL-17A in einer EST cDNA-Bibliothek aus intestinalen, intraepithelialen Lymphozyten (IEL) von Hühnern isoliert, welche mit *Eimeria acervulina* infiziert waren [13]. Die Sequenz von gg IL-17A kodiert für ein Protein mit 169 Aminosäuren und einer molekularen Masse von 18,9 kDa. Die Aminosäuresequenz zeigt eine Übereinstimmung von 46 % zum humanen IL-17A, von 37 % zum murinen IL-17A sowie von 40 % zum Protein des Herpes Virus Samiri 13 [13]. Die cDNA von gg IL-17F wurde in Concanavalin A stimulierten Milzlymphozyten identifiziert und kodiert ebenfalls für ein Protein mit 169 Aminosäuren mit einer molekularen Masse von 20,5 kDa [11]. Vergleichbar zum Säuger besitzt gg IL-17F eine Homologie von 53 % zu gg IL-17A. Mit den Säuger IL-17F teilt gg IL-17F 38-43 % der Aminosäuresequenzen [11]. Die Sequenz von gg IL-17D wurde aus einer cDNA-Bibliothek von Hodengewebe isoliert und kodiert für ein Protein mit 116 Aminosäuren und einer molekularen Masse von 13,3 kDa. Es besitzt mit 53-64 % eine sehr hohe Homologie zu den entsprechenden IL-17D der Menschen beziehungsweise der Mäuse [14]. IL-17D ist auf dem Chromosom 1 im Hühnergenom kodiert. Die Gene für gg IL-17A und gg IL-17F liegen auf dem Chromosom 3, in synthenischen Genregionen zu den korrespondierenden Chromosomabschnitten im Säuger-genom. Die Reihenfolge der Gene ist jedoch in umgekehrter Reihenfolge als die der Säuger [11]. Diese Anordnung lässt vermuten, dass es in den letzten gemeinsamen Vorfahren von Säugetieren und Vögeln vor über 300 Millionen Jahren zu einer chromosomalen Inversion der Gene für IL-17A und IL-17F gekommen ist. Die genetischen Verwandtschaftsbeziehungen der Zytokine IL-17A, IL-17F und IL-17D von Mensch, Maus, Haushuhn, Ente und Gans sind mit Hilfe eines phylogenetischen Baumes in Abbildung 3 (Seite 18) dargestellt.



**Abbildung 3: Phylogenetische Analyse der Zytokine IL-17A, IL-17D und IL-17F**

Phylogenetischer Vergleich der IL-17A, IL-17D und IL-17F Zytokine von Mensch (*Homo sapiens*), Maus (*Mus musculus*), Huhn (*Gallus gallus*), Ente (*Anas platyrhynchos*) und Gans (*Anser cygnoides*). Der Neighbor-Joining Baum wurde auf Basis übereinstimmender Aminosäuresequenzen durch den Clustal W Algorithmus mit Hilfe des Programms MEGA 5 erstellt [119]. Die Bootstrapwerte sind an der Basis der Baumgabelungen angegeben. Die Aminosäuresequenzen wurden vom National Center for Biotechnology Information (NCBI) bezogen.

IL-17 Zytokine wurden nicht nur im Haushuhn, sondern auch im Genom der Ente (*Anas platyrhynchos*) und der Gans (*Anser cygnoides*) identifiziert. Alle bisher untersuchten IL-17-Vertreter der Vögel weisen untereinander eine hohe Homologie auf. Die cDNA von IL-17A der Enten wurde aus Concanavalin A stimulierten Milzlymphozyten isoliert und kodiert für ein Protein mit 169 Aminosäuren und einem molekularen Gewicht von 18,8 kDa [120]. Enten IL-17A weist eine Homologie von 84 % zu der Aminosäuresequenz von gg IL-17A und von 36- 47 % zu den orthologen IL-17A der Säuger auf [120]. Die cDNA für IL-17A in Gänsen wurde aus Lymphozyten des Thymus isoliert [121]. Das Gänse IL-17A besteht ebenfalls aus 169 Aminosäuren und weist eine molekulare Masse von 18,9 kDa auf. Es ist zu 95,5 % und 84,6 % homolog zu IL-17A der Enten beziehungsweise der Hühner. Die cDNA von Enten IL-17F wurde in Concanavalin A stimulierten Milzlymphozyten identifiziert und kodiert für ein Protein mit 166 Aminosäuren mit einem molekularen Gewicht von 18,6 kDa [122]. Die Aminosäuresequenz des Enten IL-17F ist zu 77,5 % homolog mit gg IL-17F und zu 53,5 % mit Enten IL-17A. Zudem weist Enten IL-17F eine Übereinstimmung von 37-46 % mit den korrespondierenden IL-17F der Säuger auf.

### 3.2.2 Struktur der gg IL-17 Zytokine

Die Aminosäuresequenzen von gg IL-17A, gg IL-17D und gg IL-17F weisen sechs Zystein-Reste auf. Diese sind bei Mensch, Maus und Haushuhn für die drei aufgeführten Zytokine zwischen den Spezies hochkonserviert [11, 13, 14]. Die Sequenzanalysen lassen vermuten, dass die IL-17 Familienmitglieder beim Haushuhn ebenfalls als Dimere gebildet werden, welche über Disulfidbrücken miteinander verbunden sind. Es ist nicht bekannt, ob die IL-17 Zytokine des Haushuhnes, wie bei den Säugern, auch als Heterodimere sezerniert werden. Kim et al. zeigten, dass Enten IL-17A und IL-17F in vitro Heterodimer ausbilden können [122].

### 3.2.3 Bildung der gg IL-17 Zytokine

Die Expression von gg IL-17A- und gg IL-17F-mRNA wurde in Mitogen stimulierten Milzlymphozyten und in der Retikuloendothelialvirusinfizierten Hühner-Lymphoblastenzelllinie CU205 nachgewiesen [11, 13]. Die CU205-Zelllinie ist als CD3<sup>+</sup>, CD4<sup>+</sup>, CD8<sup>+</sup>, TCR1<sup>+</sup>, TCR2<sup>+</sup> und TCR3<sup>+</sup> charakterisiert. Basierend auf qPCR Analysen, ist gg IL-17A und gg IL-17F in Dünndarm und Dickdarm hoch exprimiert, was eine wichtige Rolle in der Darmhomöostase vermuten lässt. Die Expression von gg IL-17F ist in geringen Mengen in unterschiedlichen Geweben, wie der Leber, der Niere, dem Herzen, und der Milz, nachweisbar [11]. Gg IL-17D ist, wie die Säuger IL-17D, in vielen Geweben des Huhnes exprimiert, insbesondere in Thymus, Pankreas und Lunge [14].

### 3.2.4 Rezeptoren der gg IL-17 Zytokine

Die Rezeptoren der gg IL-17 Zytokinfamilie sind weitgehend unerforscht. Die cDNA des gg IL-17RA wurde in einer cDNA-Bibliothek von Thymusgewebe des Huhnes identifiziert [123] und kodiert für ein Protein mit 855 Aminosäuren mit einer molekularen Masse von 96.58 kDa. Gg IL-17RA weist eine 46 % ige Homologie zu der Aminosäuresequenz der humanen oder murinen IL-17RA-Rezeptoreinheiten auf. Vergleichbar zu den Säugerrezeptoren kodiert die cDNA für eine transmembrane, eine extrazelluläre und eine lange intrazelluläre Region. Die extrazelluläre Domäne weist eine Fibronektin III-ähnliche Region auf. Der intrazelluläre Anteil des gg IL-17RA besitzt eine SEFIR-ähnliche Domäne [123]. Dies lässt vermuten, dass die Signalwege am Rezeptor für IL-17 bei Huhn und Mensch übereinstimmen [123].

Die Expression des gg IL-17RA kann auf mRNA-Ebene in vielen Geweben, wie Darm, Bursa, Milz, Leber, Lunge und insbesondere im Thymus und Herz, nachgewiesen werden. Relativ hohe Expressionen lassen sich auch in der Hühner-Makrophagen-Zelllinie HD11 sowie in embryonalen Hühnerfibroblasten detektieren. Nach Stimulation von Milzlymphozyten mit den Mitogenen Lipopolysaccharid oder Concanavalin A wird die Expression des Rezeptors vermindert. Dies kann ebenfalls nach Infektion mit *Eimeria tenella* im Caecum und nach Infektion mit *Eimeria maxima* im Jejunum nachgewiesen werden [123]. Entsprechend zum Säuger bindet gg IL-17RA gg IL-17A [123]. Eine Verminderung der Expression des gg IL-17RA hemmt den biologischen Effekt von gg IL-17A sowie gg IL-17F auf embryonale Fibroblasten [123]. Daraus ist zu schließen, dass, vergleichbar zum Säuger, der gg IL-17RA sowohl gg IL-17A als auch gg IL-17F bindet. Es ist nicht erforscht, ob gg IL-17RA ebenfalls heterodimere Komplexe bildet und ob es in der Affinität sowie der Verteilung der Rezeptoruntereinheiten Unterschiede gibt.

### **3.2.5 Funktion der gg IL-17 Zytokine**

Die bis jetzt nachgewiesenen Effekte von IL-17 Zytokinen im Haushuhn sind vergleichbar zu den IL-17 Zytokinen der Säuger. Gg IL-17A und gg IL-17F stimulieren die Freisetzung von IL-1 $\beta$ , IL-6 und IL-8 in embryonalen Hühnerfibroblasten [11, 13, 124]. Gg IL-17D induziert ebenfalls die Expression von IL-6 und IL-8 in Hühnerfibroblasten [14]. Die biologische Aktivität von gg IL-17A ist, basierend auf qPCR-Analysen, geringfügig potenter als die von gg IL-17F [11, 123]. Gg IL-17A erhöht, vergleichbar zu Säugern, die Migration von neutrophilen Granulozyten [124]. Durch Neutralisation von gg IL-17A wird die Expression von IL-12 und IFN- $\gamma$  erhöht. Umgekehrt vermindert gg IL-17A die Expression der Th1-spezifischen Zytokine [124].

### 3.2.6 Bedeutung von gg IL-17A und gg IL-17F in der Wirtsabwehr

Eimerien stellen eine der wirtschaftlich bedeutendsten Infektionskrankheiten des Haushuhns dar. Zu den wichtigsten Eimerienarten beim Haushuhn gehören *Eimeria tenella*, *Eimeria maxima*, *Eimeria acervulina*, *Eimeria brunetti*, *Eimeria necatrix*, *Eimeria mitis* und *Eimeria praecox* [118]. T-Lymphozyten und ihre Zytokine sind für die Immunreaktion gegen Eimerieninfektionen in Säugern und Vögeln essentiell [118]. Die IL-17 Zytokine können durch ihre hohe Expression im Darm und ihrer proinflammatorischen Effekte wichtige Mediatoren während der Eimerieninfektion darstellen. Die Beteiligung und die Auswirkung der IL-17 Zytokine während Kokzidieninfektionen werden intensiv untersucht. Infektionsstudien zeigen eine gesteigerte Expression von gg IL-17F und gg IL-17A in duodenalem und jejunalem Gewebe nach Infektion mit *Eimeria maxima* [11, 123, 125]. Die Expression von gg IL-17A wird durch *Eimeria tenella* im caecalen Gewebe nicht verändert. Eine Erhöhung des mRNA-Spiegels von gg IL-17A in den ersten Stunden nach der Infektion ist jedoch detektierbar [124]. Zudem ist eine moderate Steigerung der gg IL-17F-Expression nachweisbar [11, 123, 125]. Zhang et al. färbten gg IL-17A mit Hilfe von polyklonalen Kaninchen-anti-Hühner-IL-17A-Antikörpern im Lysat von caecalen *Eimeria tenella*-infizierten IEL [124]. Infolge einer Infektion mit *Eimeria acervulina* wird die Expression von gg IL-17A in IEL des Duodenums stark erhöht [125].

Kryptosporidien sind neben den Eimerien eine wichtige Kokzidien-Erkrankung der Haushühner. *Cryptosporidium baileyi* besiedelt vor allem den Respirationstrakt, die Kloake und die Bursa fabricii [126]. Durch die Infektion werden die Th17-typischen Zytokine IL-17, IL-1 $\beta$ , IL-6 und TGF- $\beta$  in der Trachea und der Milz hochreguliert [127].

Infektionsstudien haben zudem gezeigt, dass nach einer Infektion mit *Salmonella gallinarum* die Expression von gg IL-17A und gg IL-17F in der Leber und der Milz erhöht sind. Nach einer Infektion mit *Salmonella typhimurium* ist dies nicht der Fall [123].

Die Ergebnisse dieser Infektionsstudien lassen auf eine Beteiligung von gg IL-17A und gg IL-17F in der Immunantwort schließen. Die Expression der Zytokine variiert je nach Erreger, Gewebe und der Zeit nach der Infektion.

### 3.2.7 Anwendung von gg IL-17A

Es wurden erste Studien durchgeführt, die gg IL-17A als Impfadjuvans in Form eines Expressionsplasmids gegen die Infektion mit Eimerien untersuchen. Ohne die Kombination mit einem Eimerienantigen beeinflusst dies den Infektionsverlauf mit Eimerien nicht [118]. Durch den Einsatz einer DNA-Impfung mit einem Expressionsplasmid, kodierend für das Oberflächenantigen MZP-57 von *Eimeria tenella* und gg IL-17A, wird die Ausscheidung der Oozysten sowie die intestinalen Läsionen stärker vermindert, als bei einer Impfung von MZP-57 allein [128]. Die Steigerung der Immunität infolge einer Impfung durch gg IL-17A ist abhängig von dem eingesetzten Impfantigen und beinhaltet noch eine große Varianz. Durch den Einsatz von aufgereinigtem Profilin, einem Antigen von *Eimeria acervulina*, zusammen mit gg IL-17A DNA-Vakzine in Embryonen ist der Immunglobulinspiegel im Serum stärker erhöht sowie die Ausscheidung der Oozysten nach einer Infektion weiter vermindert, als bei einer Impfung mit Profilin allein [129]. Demgegenüber führt die Impfung mit einer DNA-Vakzine für Profilin und gg IL-17A nicht zu einer Steigerung der Immunität [129]. Zhang et al. zeigten wiederum, dass durch die Administration IL-17-neutralisierender polyklonaler Antikörper die intestinalen Läsionen, die Rekrutierung von neutrophilen Granulozyten sowie die Oozystenusscheidung durch *Eimeria tenella* reduziert werden und die infizierten Hühner an Gewicht zunehmen [124].

Die Rolle der IL-17 Zytokine während einer parasitären Infektion wird noch kontrovers diskutiert und steht im Fokus intensiver Erforschung. Für definitive Aussagen über die Regulation der Expression während einer Infektion sowie der immunregulatorischen Mechanismen der IL-17 Zytokine bedarf es weiterer Untersuchungen. Eine wichtige Voraussetzung für die weitere Erforschung der IL-17 Zytokine beim Haushuhn ist die Verfügbarkeit spezifischer mAK.

## 4 Publikation

Developmental and Comparative Immunology 73 (2017) 27–35



Contents lists available at ScienceDirect

Developmental and Comparative Immunology

journal homepage: [www.elsevier.com/locate/dci](http://www.elsevier.com/locate/dci)



### Generation of glycosylphosphatidylinositol linked chicken IL-17 to generate specific monoclonal antibodies applicable for intracellular cytokine staining<sup>☆</sup>



Isabelle Walliser, Thomas W. Göbel<sup>\*</sup>

*Institute for Animal Physiology, Department of Veterinary Sciences, University of Munich, Veterinärstrasse 13, 80539 Munich, Germany*

#### ARTICLE INFO

##### Article history:

Received 22 December 2016

Received in revised form

6 March 2017

Accepted 6 March 2017

Available online 8 March 2017

##### Keywords:

IL-17A

IL-17F

GPI-anchor

Chicken

Intracellular cytokine staining

#### ABSTRACT

Interleukin 17 (IL-17) cytokines play a crucial role in host defense and inflammatory diseases. Of the six mammalian IL-17 members five are described in the chicken (gg) genome. A novel method that attached cytokines to the surface of cells via a GPI linker was established to generate two chicken IL-17A and one chicken IL-17F specific mab. Recombinant gg IL-17A and gg IL-17F that showed dimerization in Western blot were used to verify the antibodies specificity. The mab could detect gg IL-17 by intracellular cytokine staining as demonstrated on cells expressing recombinant IL-17. Furthermore IL-17A and lower amounts of IL-17F were detectable in CD4 positive T cells of stimulated splenocytes. In conclusion, we have generated novel tools to analyze chicken IL-17 in more detail and demonstrated that the surface expression of cytokines is a reliable method to generate specific mab applicable for intracellular cytokine staining.

© 2017 Elsevier Ltd. All rights reserved.

#### 1. Introduction

IL-17 cytokines are involved in a broad range of cellular activities. Their effects facilitate host defense against extracellular bacteria (Cho et al., 2010; Ishigame et al., 2009), fungi (Huang et al., 2004; Rudner et al., 2007; Saijo et al., 2010) or parasites (Kelly et al., 2005; Miyazaki et al., 2010), but they are also known as key mediators in autoimmune diseases like psoriasis, inflammatory bowel disease, rheumatoid arthritis, multiple sclerosis or asthma (Jin and Dong, 2013; Weaver et al., 2007). In mammals the IL-17 cytokine family includes six members: IL-17A, B, C, D, E and F (also called IL-25) (Kolls and Linden, 2004; Moseley et al., 2003; Weaver et al., 2007). The regulation and biological effect of IL-17A and IL-17F have been studied best until now. They are highly homologous to each other with about 50% identical amino acid sequence (Kolls and Linden, 2004; Moseley et al., 2003; Weaver et al., 2007). The IL-17 cytokines represent structural homologs of the cysteine knot family of proteins (Hymowitz et al., 2001). All

family members contain four highly conserved cysteine residues that form two intrachain disulfide bonds (Hymowitz et al., 2001; Moseley et al., 2003). IL-17A and IL-17F are produced as disulfide linked homodimers (30–38 kDa) but also as IL-17A/F heterodimers (Chang and Dong, 2007; Wright et al., 2007). Of the six IL-17 members described for mammals five are identified in the chicken (gg) genome, namely gg IL-17A, B, C, D, F. Gg IL-17A, gg IL-17D and gg IL-17F have been characterized best to date. Gg IL-17A (Min and Lillehoj, 2002) shares about 46% identity with human IL-17A (Yao et al., 1995) and 37% with mouse IL-17A (Kennedy et al., 1996). Gg IL-17F (Kim et al., 2012) shares 38–43% amino acid sequence homology with corresponding mammalian IL-17F and 53% with gg IL-17A. The genes encoding gg IL-17A and gg IL-17F are located on chromosome 3, a region syntenic to the corresponding mammalian chromosomes. Gg IL-17A and gg IL-17F have about the same length of 170 and 169 amino acids, respectively and a calculated molecular mass of about 18.9 kDa (Kim et al., 2012; Min and Lillehoj, 2002). IL-17 cytokines are produced by cells of the innate and adaptive immune system. IL-17A and IL-17F are mostly co-expressed by CD4<sup>+</sup> T helper 17 cells (Th17) indicating similar regulation mechanism (Yang et al., 2008). Expression of IL-17 is also detectable in CD8<sup>+</sup> T cells (Liu et al., 2007),  $\gamma\delta$ -T cells (Hamada et al., 2008; Lockhart et al., 2006) as well as natural killer T cells (NKT),

<sup>☆</sup> Abbreviations: GPI, glycosylphosphatidylinositol anchor; gg, gallus gallus.

<sup>\*</sup> Supported by DFG Grant GO489/5–2.

<sup>\*</sup> Corresponding author.

E-mail address: [goebel@imu.de](mailto:goebel@imu.de) (T.W. Göbel).



**Table 1**  
Sequences of primers.

gg IL-17A	1939	atgtctccgacccctattctcc
	1940	agcctgggtgctggatcagt
gg IL-17F	1941	atggcttttctagctgtctg
	1942	ggactgggtgctggatgaccg
gg IL-17A GPI	2026	Gagcagcagcacaagtagcaaggtgatacgccag <sup>a</sup>
	2027	cagatctccgcccctagcctggtgctggatcag <sup>a</sup>
gg IL-17F GPI	1921	gacgacgacgacaagaatcaccctatgggaag <sup>a</sup>
	1922	cagatctccgcccctagactggtgctggatgac <sup>a</sup>
gg IL-17A FLAG	1983	cccaagctggcctctgatgtctccgaccccttattc
	1984	Cccaagctggcctctattatcgtcagctgttgaatcagcctggtgctggatc <sup>b</sup>
gg IL-17F FLAG	1981	cccaagctggcctctgatgtcttctgtagctgtg
	1982	ccaagctggccttttattatcgtcagctgttgaatcagcctggtgctggatg <sup>b</sup>

<sup>a</sup> Underlined sequences mark overlaps to vector arms.<sup>b</sup> Bold letters mark nucleotides encoding the FLAG epitope.

natural killer cells (NK), lymphoid tissue inducer cells (LTi), macrophages, paneth cells or neutrophils (Ferretti et al., 2003) as reviewed in Cua and Tato (2010), Reynolds et al. (2010).

Conclusive expression analysis in chickens has not been performed. Expression data suggest that gg IL-17 cytokines are also mainly derived from T cells. Gg IL-17A and gg IL-17F mRNA levels can be detected in REV-transformed lymphoblast cell line CU205 and mitogen stimulated splenic lymphocytes (Kim et al., 2012; Min and Lillehoj, 2002). In mammals IL-17A and IL-17F are highly related and induce the expression of proinflammatory cytokines in various cell types (Jovanovic et al., 1998; Yao et al., 1995). IL-17A and IL-17F also play an important role in recruiting neutrophils (Laan et al., 1999) or macrophages and enhancing granulopoiesis (Schwarzenberger et al., 1998). In chickens IL-17A and IL-17F are highly expressed in small and large intestine suggesting a role in gut homeostasis. In contrast to gg IL-17A, low levels of gg IL-17F mRNA are widely detectable in most tissues (Kim et al., 2012). Comparable to mammals, both gg IL-17 members induce the expression of proinflammatory cytokines such as IL-1 $\beta$ , IL-6 and IL-8 in primary chicken embryonic fibroblasts (CEFs) (Kim et al., 2012; Min and Lillehoj, 2002; Zhang et al., 2013). Infection studies indicate that similar to mammals, gg IL-17A enhances neutrophil migration (Zhang et al., 2013). Furthermore, numerous infection models have demonstrated up- and downregulation of gg IL-17 mRNA levels, depending on infection model, tissue type and time post infection (Hong et al., 2006; Kim et al., 2014).

All these studies confirm an important role of IL-17 family members in the chicken. The lack of appropriate reagents has limited further investigations of the IL-17 family, in particular phenotypic analysis of the T cells producing IL-17 by intracellular cytokine staining. Here we describe a novel method to generate anti-cytokine mab and demonstrate their applications to the gg IL-17 system.

## 2. Materials and methods

### 2.1. Animals

Balb/c mice were obtained from Charles River Laboratories (Sulzfeld, Germany) and maintained under standard conditions with unlimited access to food and water. Mice were immunized on day 0, 3 and 9 with cell suspensions of  $1 \times 10^7$  transfected HEK 293 cells in a volume of 70–100  $\mu$ l PBS. On day 11 mice were killed by cervical dislocation. Chicken line M11 was kindly provided by S. Weigend (Federal Research Institute for Animal Health, Mariensee, Germany). Fertilized eggs were incubated and hatched at the Institute for Animal Physiology, Munich, Germany. The chickens were maintained under conventional conditions. The experiments

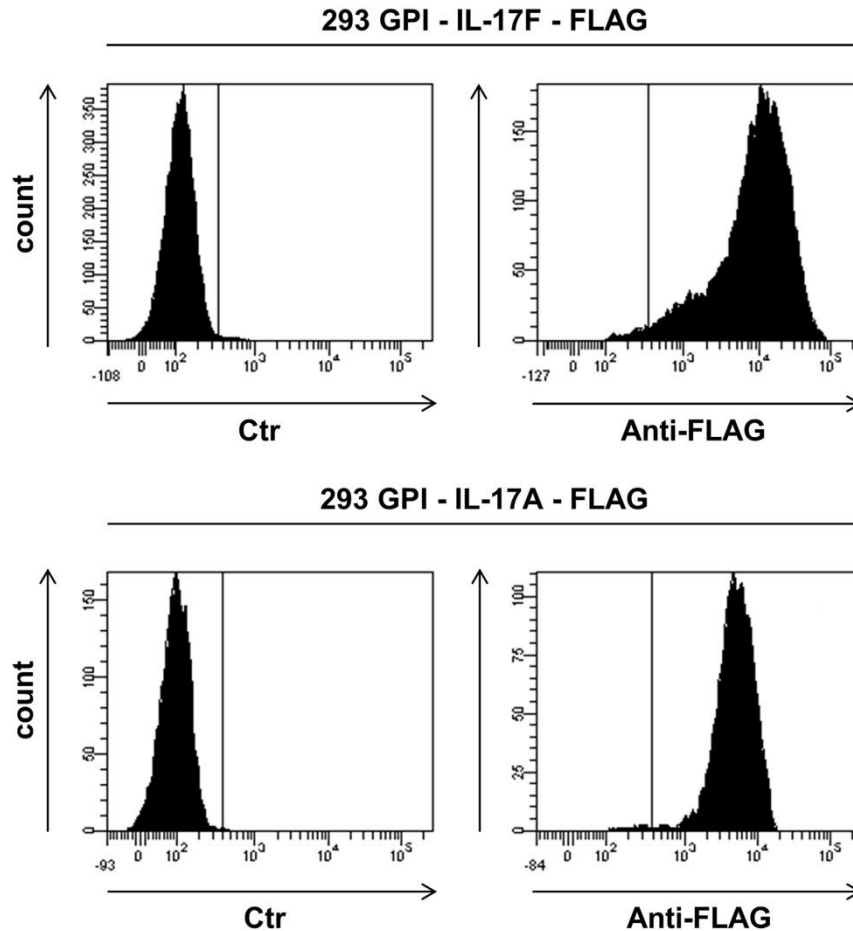
were done with chickens at the age of 10–12 weeks.

### 2.2. Cell culture

Human embryonic kidney cells (HEK) 293 and mouse myeloma cell line Ag8.653 were cultured in Roswell Park Memorial Institute (RPMI) 1640 Medium (Thermo Fisher Scientific, Waltham, Massachusetts) with 10% FBS at 37 °C and 5% CO<sub>2</sub>. Hybridoma cells derived from fusion with Ag8.653 at first were cultured in RPMI with 17% Medium 199 Earle, 10% FBS Ultra low Ig, 2% HAT Supplement 50 $\times$ , 1% penicillin/streptomycin at 37 °C and 5% CO<sub>2</sub>. All medium components were obtained by Biochrom (Berlin, Germany). After two weeks medium composition was changed to RPMI with 17.2% Medium 199 Earle, 10% FBS, 1% HT Supplement 100 $\times$  (Thermo Fisher Scientific), 1% penicillin/streptomycin. Splenocytes were obtained by pushing the organ through a stainless steel sieve and subsequent density centrifugation of the single cell suspension on Biocoll Separating Solution (Biochrom) (Göbel et al., 1996). Prepared splenocytes were cultured for one day in RPMI 1640 Medium with 10% FBS and 1% penicillin/streptomycin at 41 °C.

### 2.3. Constructs and expression of gg IL-17A and gg IL-17F

Gg IL-17A and gg IL-17F encoding cDNA sequences were amplified by PCR on cDNA of a retroviral transformed chicken lymphoblast  $\gamma\delta$  T cell line 857-2 using primers 1939–1940 for gg IL-17A and 1941–1942 for gg IL-17F (primer numbers refer to sequences listed in Table 1). The PCR products for each cytokine were cloned into pcDNA 3.1 (Invitrogen, Carlsbad, California) including C-terminal V5/HIS tag and sequenced. All subsequent cloning steps were performed using these plasmids as templates. For the expression of the cytokines linked to a glycosylphosphatidylinositol (GPI) anchor a previously generated plasmid was used, that encoded the gg MHC signal peptide followed by a FLAG epitope, the gg IL-2 sequence flanked by an EcoRI and HindIII site and an N-terminal sequence encoding for a short linker and a prototypic GPI anchor (LSGGSGGGGLAPPAGTTDAHPGRSVVPALLPLLAGTLLILE-TATAP) as described (Lin et al., 1990). The IL-2 encoding sequence was replaced by EcoRI and HindIII restriction digest followed by Gibson assembly (NEBioLabs, Ipswich, Massachusetts) with PCR products generated with primers 2026–2027 for gg IL-17A and 1921–1922 for gg IL-17F. The gg IL-17A and gg IL-17F encoding constructs (0.7  $\mu$ g) were transfected into HEK 293 cells using Metafectene (Biontex, Munich, Germany). Transfected cells, designated as 293 GPI-IL-17A-FLAG or 293 GPI-IL-17F-FLAG throughout the manuscript, were selected with neomycin (G418) (Biochrom) and screened for their FLAG surface expression by flow cytometry (FACS Canto; BD Biosciences, Franklin Lakes, New Jersey).



**Fig. 1. Transfected HEK 293 express GPI-linked chicken IL-17 cytokines.**

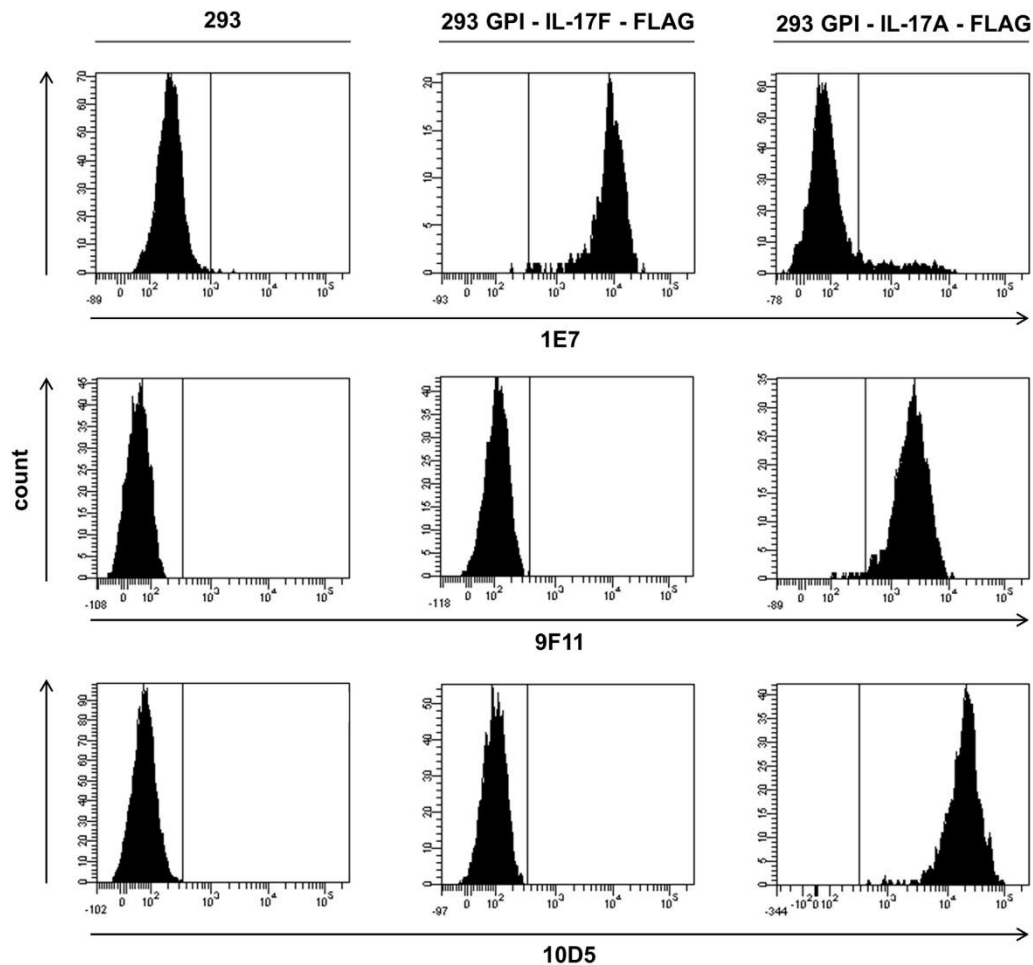
293 cells were transfected with vectors encoding FLAG tagged gg IL-17A (A) or gg IL-17F (B) linked with a GPI anchor. Transfected cells were stained with mouse-anti-FLAG mab or irrelevant control mab followed by secondary goat-anti-mouse-PE conjugate.

Transfected cells were stained with a mouse-anti-FLAG mab (Sigma Aldrich, St. Louis, Missouri) followed by secondary goat-anti-mouse-PE conjugate (Southern Biotech, Birmingham, USA). Aminoactinomycin D (Panreac Applichem, Darmstadt, Germany) was added for life-death control. For generating plasmids encoding FLAG tagged gg IL-17 cytokines Sleeping Beauty (SB) vectors psBbi-RB for gg IL-17A and psBbi-GP for gg IL-17F were digested by SfiI (Kowarz et al., 2015). Gg IL-17A and gg IL-17F were amplified using primers 1983–1984 and 1981–1982 respectively. PCR products were cloned by Gibson Assembly. For stable transfection, HEK 293 cells were co-transfected with a gg IL-17A or gg IL-17F encoding SB vector (0.665 µg) and a transposase encoding vector (0.035 µg) using Metafectene (Biontex). The stable cells designated 293 IL-17A-FLAG or 293 IL17F-FLAG were incubated for 24 h after transfection and selected with blasticidin (10 µg/ml) or puromycin (1 µg/

ml) depending on the resistance of the vector backbone.

#### 2.4. Western Blot

Cell culture supernatants of recombinant gg IL-17A or gg IL-17F were mixed with 6× SDS Loading Buffer (TRIS-HCl/SDS buffer pH 6.8, 30% Glycerol, 10% SDS, 0.012% bromophenol blue) and 1M DTT (chemicals by Panreac Applichem) or ddH<sub>2</sub>O respectively and heated at 95 °C for 5 min. Samples were separated by 12% SDS polyacrylamid gel and electroblotted onto nitrocellulose membrane (Sigma Aldrich). Membranes were blocked with 5% nonfat dry milk (Panreac Applichem), washed once with PBS containing 0.05% Tween (Panreac Applichem) (PBS-T) for 15 min at room temperature and incubated with a peroxidase conjugated anti-FLAG antibody (Sigma Aldrich) in PBS-T for 1 h at room



**Fig. 2. Specificity of mab against gg IL-17A and gg IL-17F.**

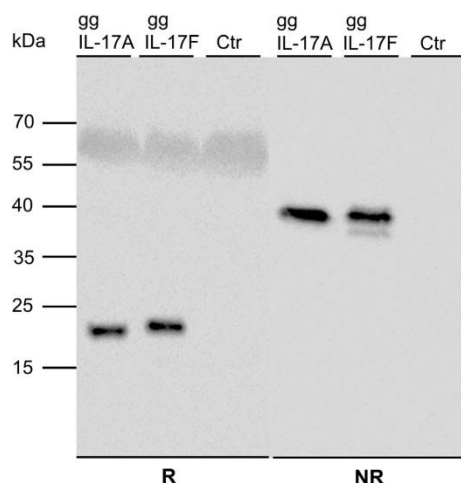
Mouse anti gg IL-17F (1E7, IgG1) and anti gg IL-17A (9F11, IgG1; 10D5, IgG2a) mab followed by secondary goat-anti-mouse-PE conjugate were used to stain FLAG tagged gg IL-17A or gg IL-17F transfected 293 cells, respectively.

temperature. Protein bands were visualized by chemiluminescence and light emission was analyzed by MicroChemi 4.2 (DNR Bio-Imaging Systems, Jerusalem, Israel).

#### 2.5. Generation of mab and staining procedures

Balb/c mice were immunized with  $1 \times 10^7$  HEK 293 GPI-IL-17A-FLAG or HEK 293 GPI-IL-17F-FLAG. Cells were fused with mouse myeloma cell line Ag 8.653 using polyethylene glycol (PEG) (Roche, Basel, Suisse) according to standard procedures. Hybridomas were tested by staining non-transfected HEK 293 and transfected HEK 293 GPI-IL-17A-FLAG or 293 GPI-IL-17F-FLAG via flow cytometry using a secondary goat-anti-mouse-PE conjugate (Southern

Biotech). As positive control transfected HEK 293 cells were stained with a mouse-anti-FLAG mab (Sigma Aldrich) instead of hybridoma supernatant. Aminoactinomycin D (Panreac Applichem) was added for life-death control. One mouse-anti-chicken-IL-17F mab 1E7 (IgG1) and two mouse-anti-chicken IL-17A mab 9F11 (IgG1) and 10D5 (IgG2) were obtained. Mab were purified by protein G agarose (Merck Millipore, Darmstadt, Germany). For blocking experiments the mab were diluted in cell culture supernatant of the appropriate recombinant cytokine before staining. The mab were tested for intracellular staining on transfected HEK 293 IL-17A-FLAG or HEK 293 IL-17F-FLAG cell lines. For this purpose transfected HEK cells were diluted to  $1 \times 10^5$  cells/ml and incubated with the protein transport inhibitor Golgi Stop (BD Bioscience) (1:1500) for 16 h.



**Fig. 3. Recombinant gg IL-17 spontaneously form homodimers.**

HEK 293 cells were transfected with vectors encoding FLAG-tagged gg IL-17A or gg IL-17F. Cell culture supernatant was separated on SDS-Page under reducing (R) and non-reducing conditions (NR), followed by Western blotting. Supernatant of mock transfected cells served as a negative control (Ctr). Recombinant cytokines were detected with a horseradish peroxidase coupled mouse-anti-FLAG antibody. The apparent  $M_R$  of the standard is indicated.

Following HEK cells were stained with PermFixViab eFluor780 (AffymetrixBioscience, Santa Clara, California) for life-death control and treated with IC fixation buffer (AffymetrixBioscience).

Permeabilized, fixed cells were stained with purified 1E7, 9F11 or 10D5 as well as a mouse-anti-FLAG mAb (Sigma Aldrich) for positive control followed by a secondary goat-anti-mouse-APC conjugate (Southern Biotech). In addition the mab were tested to detect gg IL-17A and gg IL-17F in primary chicken cells. To this end

**Table 2**

Mean fluorescence intensity values observed after blocking experiments with recombinant cytokines.

mAb	1E7	9F11	10D5
Ctr	8579	1395	2720
gg IL-17A	8429	554	1820
gg IL-17F	3339	1357	2692

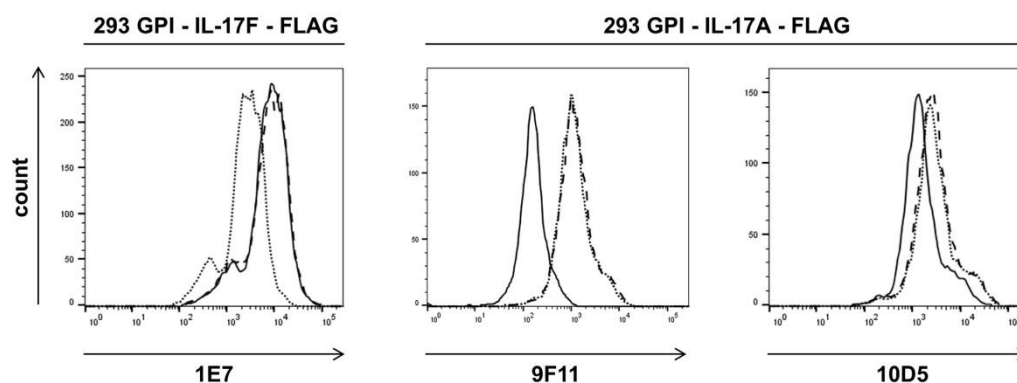
Transfected HEK cells stained with mab 1E7, 9F11, 10D5 following preincubation with a control (Ctr.; supernatant of mock transfected cells), gg IL-17A or gg IL-17F.

splenocytes were diluted to  $1 \times 10^7$  cells/ml and treated with 25 ng/ml PMA (phorbol myristate acetate) (Sigma Aldrich), 1  $\mu$ g/ml Ionomycin (Sigma Aldrich) and the protein transport inhibitor Golgi-Stop (1:1500) (BD Bioscience) for four hours. As control cells were cultured in medium without stimulation. Splenocytes were then stained with PermFixViab eFluor780 (AffymetrixBiosciences) for life death-control and treated with IC fixation buffer (AffymetrixBiosciences) according to the manufacturer's protocol. Permeabilized cells were first stained with the various mab and an isotype matched control respectively followed by a goat-anti-mouse APC conjugate (Southern Biotech). Next cells were blocked with normal mouse serum (Sigma Aldrich) and splenocytes were stained with a mouse-anti-chicken-CD4-PE-conjugate (Southern Biotech).

### 3. Results

#### 3.1. Generation of IL-17A and IL-17F specific mab

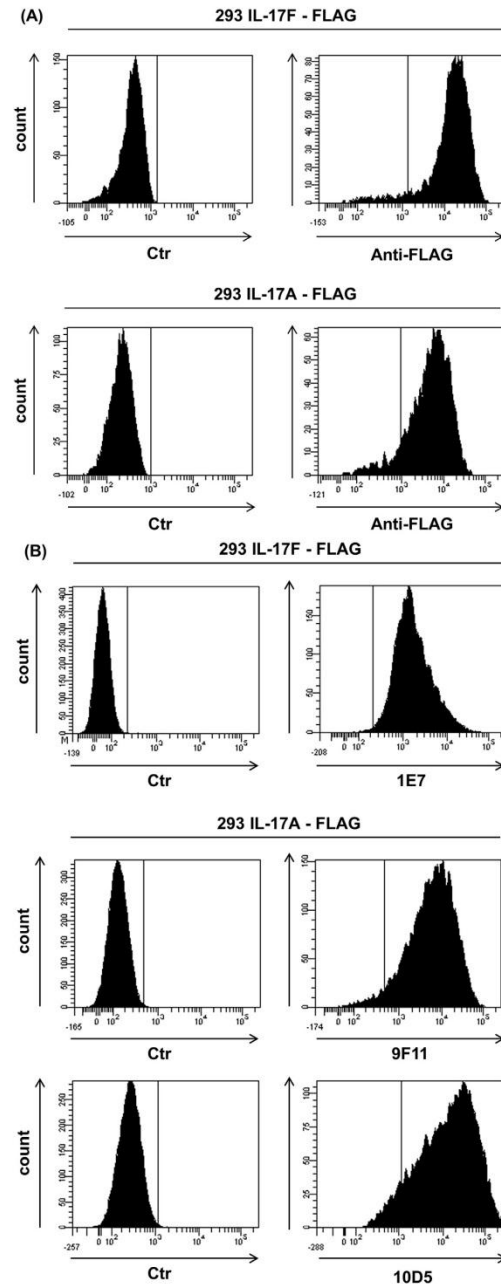
In order to generate cell lines that display cell bound gg IL-17A or gg IL-17F, the corresponding genes were cloned into a vector that adds an N-terminal FLAG epitope and a C-terminal GPI anchor. Following stable transfection the clones were screened by their surface expression of the FLAG epitope (Fig. 1). For both cytokines, cell lines were generated that expressed high levels of cytokine on their surface (Fig. 1) and these cells were further used for immunization of mice and generation of mab. The hybridoma supernatants were differentially screened on transfected versus non-



**Fig. 4. Mab binding to cell lines can be diminished by preincubation with recombinant gg IL-17.**

Cytokine specificity of 1E7, 9F11 and 10D5 mab was investigated by pre-treatment of mab with recombinant FLAG tagged gg IL-17 cytokines. The mab were diluted in cell culture supernatant of recombinant gg IL-17A (solid line), gg IL-17F (dotted line) or cell culture supernatant of mock transfected cells (dashed line) and incubated for 16 h at 4 °C. Transfected HEK 293 GPI-IL-17A-FLAG or HEK 293 GPI-IL-17F-FLAG cell lines were stained with these combinations followed by a secondary goat-anti-mouse-PE conjugate and analyzed by flow cytometry.





**Fig. 5.** Intracytoplasmic staining of recombinant chicken IL-17A and IL-17F. Transfected HEK 293 IL-17A-FLAG and 293 IL-17F-FLAG cell lines were incubated with protein transport inhibitor Golgi Stop (1:1500) about 16 h. Cells were stained with

transfected cells. With this strategy, the 1E7, 9F11 and 10D5 mab were obtained. 1E7 specifically recognized 293 GPI-IL17F-FLAG cells (Fig. 2) and it showed some crossreactivity with 293 GPI-IL17A-FLAG cells, indicating that it may cross react with IL-17A in a dose dependent manner. Both the 9F11 and 10D5 mab were reactive with the 293 GPI-IL17A-FLAG cells, but not with the 293 GPI-IL17F-FLAG cells (Fig. 2).

In conclusion, the display of cytokines on the cell surface via a GPI anchor provides a simple method to generate mab against soluble molecules.

### 3.2. Recombinant IL-17A and IL-17F form homodimers

To further test the mab, recombinant gg IL-17A and gg IL-17F were produced in HEK-293 cells. For this purpose the corresponding genes were cloned into a vector that provides an N-terminal FLAG epitope. Following transfection, the supernatants were harvested and tested by ELISA and Western Blot. ELISA using FLAG antibodies demonstrated presence of the recombinant protein (data not shown). When the supernatants were blotted and revealed with an anti-FLAG-peroxidase conjugate, we observed single protein species of approximately 20 kDa under reducing conditions and 40 kDa under non-reducing conditions, while the control supernatants of mock transfected cells did not give any signal (Fig. 3). Therefore, recombinant gg IL-17A and gg IL-17F have the propensity to form homodimers.

### 3.3. Recombinant cytokines are able to block the interaction of mab with cell lines

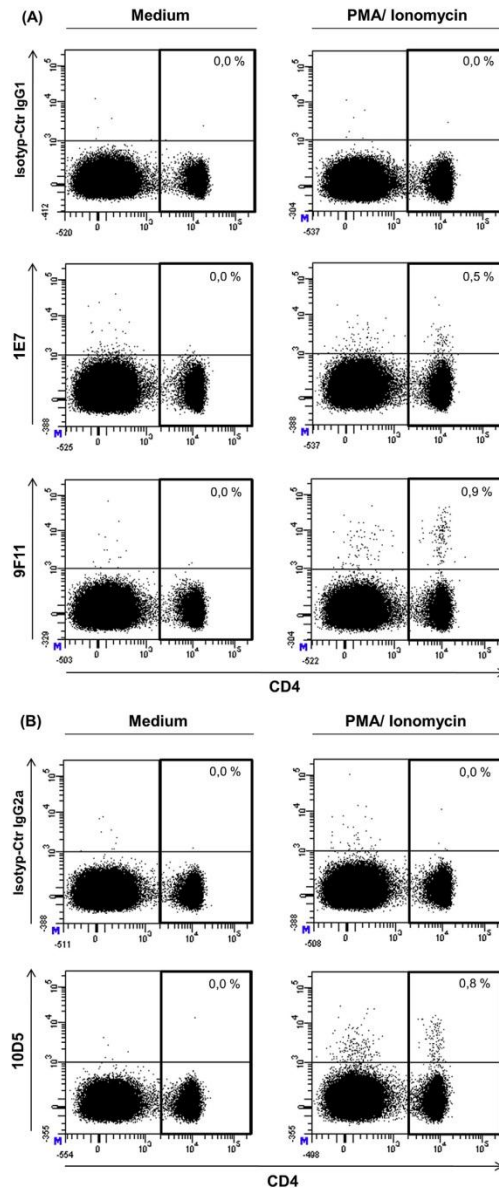
The recombinant cytokine preparations were employed to further investigate the mab specificity. The 293 GPI-IL17F-FLAG cells were stained with mab that were either pre-incubated with recombinant gg IL-17A or gg IL-17F. Flow cytometric analysis revealed that the binding of the 1E7 mab was diminished upon preincubation with gg IL-17F, but not with gg IL-17A (Fig. 4). Vice versa, the 9F11 mab staining of 293 GPI-IL17A-FLAG cells could be reduced by preincubation of the mab with gg IL-17A, but was not affected by gg IL-17F. A similar situation was observed for the 10D5 mab, although the reduction of staining was not as strong as found for 9F11 (Fig. 4). When the mean fluorescence intensity was calculated for the different combinations, the reduction of staining was clearly visible (Table 2). These experiments further provide evidence that the 1E7 mab is specific for gg IL-17F, whereas 9F11 and 10D5 recognize gg IL-17A.

### 3.4. Intracellular cytokine staining using IL-17A and IL-17F specific mab

In order to test the novel mab for intracellular staining we first established a staining system using the mouse-anti-FLAG mab. For this purpose transfected HEK 293 IL-17A-FLAG or HEK 293 IL-17F-FLAG cell lines were incubated with protein transport inhibitors followed by fixation and permeabilization. The accumulated cytokines were intracellularly detected using the mouse-anti-FLAG mab as compared to an isotype control (Fig. 5A).

Next, the IL-17 specific mab were used for intracellular staining of the cell lines (Fig. 5B). The mab 9F11 and 10D5 stained the 293 IL-17A-FLAG cells intracellularly. There was no crossreactivity with the 293 IL-17F-FLAG cells (Fig. 5B). As observed for the surface staining,

PermFix Viability Dye as life-death control, fixed and permeabilized. Cells were stained with (A) mouse-anti-FLAG mab as isotype matched control or with cytokine specific mab 1E7, 9F11 and 10D5 (B) followed by a goat-anti-mouse-APC conjugate.



**Fig. 6.** Intracytoplasmic staining of gg IL-17A and gg IL-17F. For intracytoplasmic detection of cytokines, chicken splenocytes were treated as described in materials and methods. Unstimulated (left panels) and stimulated splenocytes (right panels) were stained with the isotype matched controls, 1E7, 9F11 (A) and 10D5 mab (B) followed by a goat-anti-mouse-APC conjugate. After blocking unspecific antibody binding with normal mouse serum, cells were stained with a mouse-anti-chicken-CD4-PE conjugate. Numbers indicate percentage of CD4<sup>+</sup> cells. One representative of three experiments is depicted.

the 1E7 mab reacted with virtually all 293 IL-17F-FLAG cells when used for intracellular staining, but in contrast to 10D5 and 9F11, there was a low degree of reactivity with 293 IL-17A-FLAG cells.

Since the mab were suitable for intracellular cytokine staining in transfected cell lines, we next tested their potential for detection of gg IL-17A and gg IL-17F in primary cells.

For this purpose splenocytes were treated with PMA, Ionomycin and the protein transport inhibitor Golgi Stop, followed by fixation and permeabilization. Splenocytes were additionally stained with a mouse-anti-chicken-CD4 PE conjugate (Fig. 6). Upon stimulation, 1E7 and 9F11 stained a small discrete CD4<sup>+</sup> population (Fig. 6A), that was absent from the IgG1 isotype control. 10D5 also reacted with a similar CD4<sup>+</sup> population upon stimulation (Fig. 6B).

In conclusion the IL-17 specific mab detected intracellular cytokines in both transfected cells and stimulated splenocytes.

#### 4. Discussion

IL-17A and IL-17F are in the focus of intense research in mammals and in the chicken, however, in the chicken appropriate tools to detect these cytokines in cells are currently not available. The generation of mab against cytokines that are applicable for intracellular cytokine staining can be very laborious and has been a drawback in the analysis of avian cytokines in many infection models. Thus studies are largely limited to the measurement of mRNA levels by qPCR or in situ hybridisation (Degen et al., 2005; Kidane et al., 2016). However, this does not give sufficient information, especially regarding the phenotype of the cells producing the relevant cytokines. As a consequence, T helper cell populations such as Th1, Th2 or Th17 subsets that are well defined in mammals (Infante-Duarte et al., 2000; Mosmann and Coffman, 1989) have not been characterized on a cellular level in chicken.

As a major problem the cytokine amount needed for immunization is high and expression of cytokines is not straightforward. The expression in prokaryotic systems frequently results in high quantities of protein, however, it mostly lacks biological activity, correct folding or glycosylation (Baneyx and Mujacic, 2004; Razaghi et al., 2016). Mab against these prokaryotic preparations of cytokines do not react in many instances with the native versions (personal observation). Vice versa, eukaryotic or insect expression systems generally result in biologically active cytokines, but the amounts that can be purified are rather small. Here we developed a different system to generate mab against chicken cytokines which can be used for intracellular staining. For this purpose, we attached a GPI anchor to the IL-17 cytokines and generated stable HEK 293 cell lines to immunize mice. Dreyer et al. used an alternative approach by attaching a heterologous transmembrane domain to different plasmodia derived proteins (Dreyer et al., 2010). Membrane bound chicken cytokines have also been used before in order to stimulate immune responses as adjuvants (Yang et al., 2009). The screening procedure following mab generation has been straightforward with a differential approach of staining transfected HEK 293 GPI IL-17A-FLAG or 293 GPI IL-17F-FLAG versus non-transfected HEK 293 cell lines resulting in one gg IL-17F specific mab (1E7) and two gg IL-17A specific mab (9F11, 10D5). The generated mab only showed an intense staining profile of the transfected cells. In order to test whether the mab would also react with native IL-17 we produced recombinant gg IL-17A and gg IL-17F as FLAG tagged versions in HEK 293 cells. The biochemical analysis revealed that both cytokines spontaneously formed homodimers. Since the staining of the respective GPI-linked IL-17 forms was diminished by the relevant homodimeric cytokines, we conclude that the mab are specific and are able to detect the native gg IL-17A and gg IL-17F, respectively. In various experiments we observed a slight crossreactivity of the 1E7 mab with IL-17A, which is not



surprising given that both cytokines share high homology. In contrast 9F11 and 10D5 only recognized gg IL-17A but not gg IL-17F. The usefulness of the mab for intracellular staining could be demonstrated for all three mab using transfected cell lines. Consequently the mab were used to screen primary chicken cells for their expression of gg IL-17A or gg IL-17F. For mammals it is well-established that there is a CD4<sup>+</sup> T helper cell subset (Th17) producing IL-17A, IL-17F and the IL-17A/IL-17F heterodimer (Aggarwal et al., 2003; Park et al., 2005; Wright et al., 2007). Accordingly the gg IL-17A specific mab 9F11 as well as 10D5 detected a small population of CD4<sup>+</sup> splenocytes producing gg IL-17A. Although less frequent, few CD4<sup>+</sup> cells expressing gg IL-17F were detectable by the mab 1E7. The lower detection rate of gg IL-17F indicates different expression levels of both cytokines in chicken T cells. Wright et al. demonstrated that activated CD4<sup>+</sup> T cells isolated from human blood express higher levels of IL-17F homodimer than of the IL-17A/F heterodimer or the IL-17A homodimer suggesting that most of the IL-17A was associated with the IL-17A/F heterodimer (Wright et al., 2007). The expression levels in chicken have to be further investigated. The generated mab provide the opportunity to analyze the protein expression of gg IL-17 in healthy and infected chickens. In conclusion, the method to generate mab against GPI linked, cell surface bound cytokines provides a successful and fast method to produce anti-cytokine mab that are applicable for intracellular cytokine staining. The immunization strategy is by far easier as compared to purification of recombinant cytokines. The described mab for gg IL-17A and gg IL-17F represent an important tool to further characterize the expression and biological function of IL-17 cytokines in the chicken. The generation of a panel of mab against additional chicken cytokines would be instrumental to phenotype T cells following infection models in more detail and would allow characterizing T helper subsets in the chicken.

#### Acknowledgements

We thank Beatrice Sperling and Marie-Luise Neulen for the great technical support.

#### References

- Aggarwal, S., Ghilardi, N., Xie, M.H., de Sauvage, F.J., Gurney, A.L., 2003. Interleukin-23 promotes a distinct CD4 T cell activation state characterized by the production of interleukin-17. *J. Biol. Chem.* 278, 1910–1914.
- Baneyx, F., Mujacic, M., 2004. Recombinant protein folding and misfolding in *Escherichia coli*. *Nat. Biotechnol.* 22, 1399–1408.
- Chang, S.H., Dong, C., 2007. A novel heterodimeric cytokine consisting of IL-17 and IL-17F regulates inflammatory responses. *Cell. Res.* 17, 435–440.
- Cho, J.S., Pietras, E.M., Garcia, N.C., Ramos, R.L., Farzam, D.M., Monroe, H.R., Magorien, J.E., Blauvelt, A., Kolls, J.K., Cheung, A.L., Cheng, G., Modlin, R.L., Miller, L.S., 2010. IL-17 is essential for host defense against cutaneous *Staphylococcus aureus* infection in mice. *J. Clin. Invest.* 120, 1762–1773.
- Cua, D.J., Tato, C.M., 2010. Innate IL-17-producing cells: the sentinels of the immune system. *Nat. Rev. Immunol.* 10, 479–489.
- Degen, W.G., Daal, N., Rothwell, L., Kaiser, P., Schijns, V.E., 2005. Th1/Th2 polarization by viral and helminth infection in birds. *Vet. Microbiol.* 105, 163–167.
- Dreyer, A.M., Beauchamp, J., Matile, H., Pluschke, G., 2010. An efficient system to generate monoclonal antibodies against membrane-associated proteins by immunisation with antigen-expressing mammalian cells. *BMC Biotechnol.* 10, 87.
- Ferretti, S., Bonneau, O., Dubois, G.R., Jones, C.E., Trifilieff, A., 2003. IL-17, produced by lymphocytes and neutrophils, is necessary for lipopolysaccharide-induced airway neutrophilia: IL-15 as a possible trigger. *J. Immunol.* 170, 2106–2112.
- Göbel, T.W., Chen, C.H., Cooper, M.D., 1996. Expression of an avian CD6 candidate is restricted to alpha beta T cells, splenic CD8<sup>+</sup> gamma delta T cells and embryonic natural killer cells. *Eur. J. Immunol.* 26, 1743–1747.
- Hamada, S., Umemura, M., Shiono, T., Tanaka, K., Yahagi, A., Begum, M.D., Oshiro, K., Okamoto, Y., Watanabe, H., Kawakami, K., Roark, C., Born, W.K., O'Brien, R., Ikuta, K., Ishikawa, H., Nakae, S., Iwakura, Y., Ohta, T., Matsuzaki, G., 2008. IL-17A produced by gamma delta T cells plays a critical role in innate immunity against *listeria monocytogenes* infection in the liver. *J. Immunol.* 181, 3456–3463.
- Hong, Y.H., Lillehoj, H.S., Lee, S.H., Dalloul, R.A., Lillehoj, E.P., 2006. Analysis of chicken cytokine and chemokine gene expression following *Eimeria acervulina* and *Eimeria tenella* infections. *Vet. Immunol. Immunop.* 114, 209–223.
- Huang, W., Na, L., Fidel, P.L., Schwarzenberger, P., 2004. Requirement of interleukin-17A for systemic anti-*Candida albicans* host defense in mice. *J. Infect. Dis.* 190, 624–631.
- Hymowitz, S.G., Filvaroff, E.H., Yin, J.P., Lee, J., Cai, L., Risser, P., Maruoka, M., Mao, W., Foster, J., Kelley, R.F., Pan, G., Gurney, A.L., de Vos, A.M., Starovassnik, M.A., 2001. IL-17s adopt a cystine knot fold: structure and activity of a novel cytokine, IL-17F, and implications for receptor binding. *Embo. J.* 20, 5332–5341.
- Infante-Duarte, C., Horton, H.F., Byrne, M.C., Kamradt, T., 2000. Microbial lipopeptides induce the production of IL-17 in Th cells. *J. Immunol.* 165, 6107–6115.
- Ishigame, H., Kakuta, S., Nagai, T., Kadoki, M., Nambu, A., Komiya, Y., Fujikado, N., Tanahashi, Y., Akitsu, A., Kotaki, H., Sudo, K., Nakae, S., Sasakawa, C., Iwakura, Y., 2009. Differential roles of interleukin-17A and -17F in host defense against mucocutaneous bacterial infection and allergic responses. *J. Immunol.* 183, 108–119.
- Jin, W., Dong, C., 2013. IL-17 cytokines in immunity and inflammation. *Emerg. Microbes. Infect.* 2, e60.
- Jovanovic, D.V., Di Battista, J.A., Martel-Pelletier, J., Jolicoeur, F.C., He, Y., Zhang, M., Mineau, F., Pelletier, J.P., 1998. IL-17 stimulates the production and expression of proinflammatory cytokines, IL-beta and TNF-alpha, by human macrophages. *J. Immunol.* 160, 3513–3521.
- Kelly, M.N., Kolls, J.K., Happel, K., Schwartzman, J.D., Schwarzenberger, P., Combe, C., Moretto, M., Khan, I.A., 2005. Interleukin-17/Interleukin-17 receptor-mediated signaling is important for generation of an optimal polymorphonuclear response against *Toxoplasma gondii* infection. *Infect. Immun.* 73, 617–621.
- Kennedy, J., Rossi, D.L., Zurawski, S.M., Vega Jr., F., Kastelein, R.A., Wagner, J.L., Hannum, C.H., Zlotnik, A., 1996. Mouse IL-17: a cytokine preferentially expressed by alpha beta TCR + CD4-CD8-T cells. *J. Interferon. Cytokine. Res.* 16, 611–617.
- Kidane, F.A., Bilic, I., Mitra, T., Wernsdorf, P., Hess, M., Liebhart, D., 2016. In situ hybridization to detect and localize signature cytokines of T-helper (Th) 1 and Th2 immune responses in chicken tissues. *Vet. Immunol. Immunop.* 175, 51–56.
- Kim, W.H., Jeong, J., Park, A.R., Yim, D., Kim, S., Chang, H.H., Yang, S.H., Kim, D.H., Lillehoj, H.S., Min, W., 2014. Downregulation of chicken interleukin-17 receptor A during *Eimeria* infection. *Infect. Immun.* 82, 3845–3854.
- Kim, W.H., Jeong, J., Park, A.R., Yim, D., Kim, Y.H., Kim, K.D., Chang, H.H., Lillehoj, H.S., Lee, B.H., Min, W., 2012. Chicken IL-17F: identification and comparative expression analysis in *Eimeria*-infected chickens. *Dev. Comp. Immunol.* 38, 401–409.
- Kolls, J.K., Linden, A., 2004. Interleukin-17 family members and inflammation. *Immunol.* 21, 467–476.
- Kowarz, E., Loscher, D., Marschalek, R., 2015. Optimized Sleeping Beauty transposons rapidly generate stable transgenic cell lines. *Biotechnol. J.* 10, 647–653.
- Laan, M., Cui, Z.H., Hoshino, H., Lotvall, J., Sjöstrand, M., Gruenert, D.C., Skoogh, B.E., Linden, A., 1999. Neutrophil recruitment by human IL-17 via C-X-C chemokine release in the airways. *J. Immunol.* 162, 2347–2352.
- Lin, A.Y., Devaux, B., Green, A., Sagerstrom, C., Elliott, J.F., Davis, M.M., 1990. Expression of T cell antigen receptor heterodimers in a lipid-linked form. *Science* 249, 677–679.
- Liu, S.J., Tsai, J.P., Shen, C.R., Sher, Y.P., Hsieh, C.L., Yeh, Y.C., Chou, A.H., Chang, S.R., Hsiao, K.N., Yu, F.W., Chen, H.W., 2007. Induction of a distinct CD8 Tnc17 subset by transforming growth factor-beta and interleukin-6. *J. Leukoc. Biol.* 82, 354–360.
- Lockhart, E., Green, A.M., Flynn, J.L., 2006. IL-17 production is dominated by gamma delta T cells rather than CD4 T cells during *Mycobacterium tuberculosis* infection. *J. Immunol.* 177, 4662–4669.
- Min, W., Lillehoj, H.S., 2002. Isolation and characterization of chicken interleukin-17 cDNA. *J. Interfer. Cyt. Res.* 22, 1123–1128.
- Miyazaki, Y., Hamano, S., Wang, S., Shimanoe, Y., Iwakura, Y., Yoshida, H., 2010. IL-17 is necessary for host protection against acute-phase *Trypanosoma cruzi* infection. *J. Immunol.* 185, 1150–1157.
- Moseley, T.A., Haudenschild, D.R., Rose, L., Reddi, A.H., 2003. Interleukin-17 family and IL-17 receptors. *Cytokine Growth Factor Rev.* 14, 155–174.
- Mosmann, T.R., Coffman, R.L., 1989. TH1 and TH2 cells: different patterns of lymphokine secretion lead to different functional properties. *Annu. Rev. Immunol.* 7, 145–173.
- Park, H., Li, Z., Yang, X.O., Chang, S.H., Nurieva, R., Wang, Y.H., Wang, Y., Hood, L., Zhu, Z., Tian, Q., Dong, C., 2005. A distinct lineage of CD4 T cells regulates tissue inflammation by producing interleukin 17. *Nat. Immunol.* 6, 1133–1141.
- Razaghi, A., Owens, L., Heimann, K., 2016. Review of the recombinant human interferon gamma as an immunotherapeutic: impacts of production platforms and glycosylation. *Biotechnol. J.* 240, 48–60.
- Reynolds, J.M., Angkasekwinai, P., Dong, C., 2010. IL-17 family member cytokines: regulation and function in innate immunity. *Cytokine Growth Factor Rev.* 21, 413–423.
- Rudner, X.L., Happel, K.I., Young, E.A., Shellito, J.E., 2007. Interleukin-23 (IL-23)-IL-17 cytokine axis in murine *Pneumocystis carinii* infection. *Infect. Immun.* 75, 3055–3061.
- Saijo, S., Ikeda, S., Yamabe, K., Kakuta, S., Ishigame, H., Akitsu, A., Fujikado, N., Kusaka, T., Kubo, S., Chung, S.H., Komatsu, R., Miura, N., Adachi, Y., Ohno, N., Shibuya, K., Yamamoto, N., Kawakami, K., Yamasaki, S., Saito, T., Akira, S., Iwakura, Y., 2010. Dectin-2 recognition of alpha-mannans and induction of Th17 cell differentiation is essential for host defense against *Candida albicans*.

- Immunity 32, 681–691.
- Schwarzenberger, P., La Russa, V., Miller, A., Ye, P., Huang, W., Zieske, A., Nelson, S., Bagby, G.J., Stoltz, D., Mynatt, R.L., Spriggs, M., Kolls, J.K., 1998. IL-17 stimulates granulopoiesis in mice: use of an alternate, novel gene therapy-derived method for in vivo evaluation of cytokines. *J. Immunol.* 161, 6383–6389.
- Weaver, C.T., Hatton, R.D., Mangan, P.R., Harrington, L.E., 2007. IL-17 family cytokines and the expanding diversity of effector T cell lineages. *Annu. Rev. Immunol.* 25, 821–852.
- Wright, J.F., Guo, Y., Quazi, A., Luxenberg, D.P., Bennett, F., Ross, J.F., Qiu, Y., Whitters, M.J., Tomkinson, K.N., Dunussi-Joannopoulos, K., Carreno, B.M., Collins, M., Wolfman, N.M., 2007. Identification of an interleukin 17F/17A heterodimer in activated human CD4+ T cells. *J. Biol. Chem.* 282, 13447–13455.
- Yang, X.O., Chang, S.H., Park, H., Nurieva, R., Shah, B., Acero, L., Wang, Y.H., Schluns, K.S., Broaddus, R.R., Zhu, Z., Dong, C., 2008. Regulation of inflammatory responses by IL-17F. *J. Exp. Med.* 205, 1063–1075.
- Yang, Y., Leggat, D., Herbert, A., Roberts, P.C., Sundick, R.S., 2009. A novel method to incorporate bioactive cytokines as adjuvants on the surface of virus particles. *J. Interferon. Cytokine. Res.* 29, 9–22.
- Yao, Z., Painter, S.L., Fanslow, W.C., Ulrich, D., Macduff, B.M., Spriggs, M.K., Armitage, R.J., 1995. Human IL-17: a novel cytokine derived from T cells. *J. Immunol.* 155, 5483–5486.
- Zhang, L., Liu, R., Song, M., Hu, Y., Pan, B., Cai, J., Wang, M., 2013. *Eimeria tenella*: interleukin 17 contributes to host immunopathology in the gut during experimental infection. *Exp. Parasitol.* 133, 121–130.



## 5 Diskussion

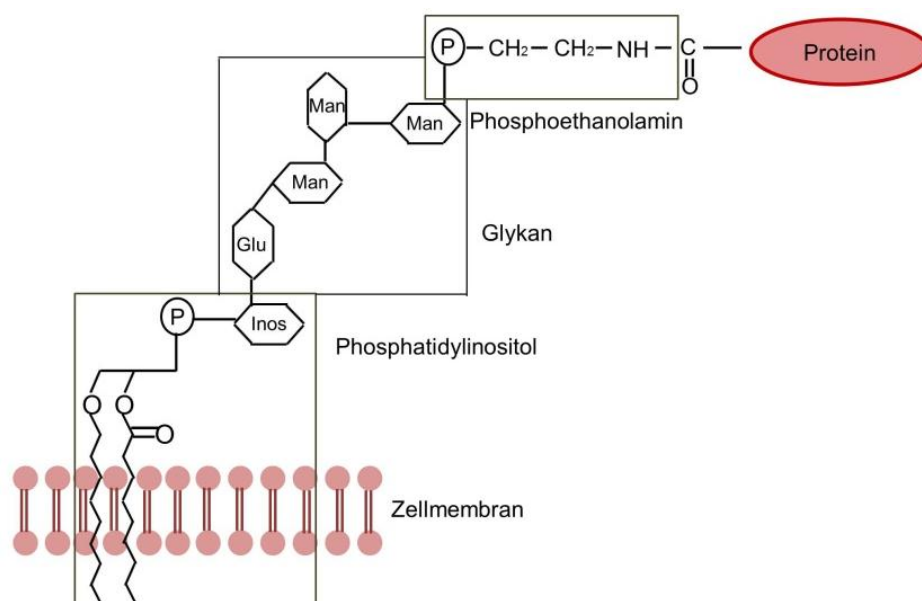
Das Haushuhn steht durch seine wirtschaftliche Bedeutung in der Geflügelindustrie im Fokus vieler Forschungsarbeiten. Für den Erhalt und die Verbesserung der Tiergesundheit sowie der Leistungsfähigkeit ist es unerlässlich, die Funktion und die Regulation des aviären Immunsystems zu verstehen. Interleukine besitzen eine Vielzahl immunregulatorischer Funktionen und können für eine gezielte Modulation des Immunsystems genutzt werden. Die IL-17 Zytokinfamilie wird durch ihre Beteiligung an protektiven Immunmechanismen, insbesondere bei Infektionen mit extrazellulären Bakterien oder Pilzen, seit langem intensiv erforscht. Im aviären Immunsystem wurden Mitglieder der IL-17 Familie identifiziert. Ihre genaue biologische Funktion, Regulation und zelluläre Herkunft sind jedoch weitgehend unbekannt. Die Voraussetzungen für eine angemessene Grundlagenforschung der aviären IL-17 Zytokine stellen neben Genexpressionsanalysen, Enzyme-linked Immunosorbent-Assays (ELISA) oder Bioassays spezifische monoklonale Antikörper (mAK) dar, wodurch eine Phänotypisierung der IL-17-positiven Zellen im Huhn ermöglicht wird.

Die Technologie der mAK-Generierung mit B-Zell- Hybridomen wurde 1975 durch Kohler und Milstein entwickelt [130]. Obwohl die Methode mittlerweile weit verbreitet und standardisiert ist, bereitet die mAK Generierung gegen Proteinantigene, insbesondere gegen Zytokine, immer wieder Schwierigkeiten. Ein Problem ergibt sich aus der großen Menge an aufgereinigtem Protein, welches für die Immunisierung sowie das Testverfahren der Hybridome benötigt wird. Es können hierfür unterschiedliche Expressionssysteme genutzt werden. Mit Hilfe prokaryotischer Systeme werden schnell große Mengen Protein generiert. Das Bakterium *Escherichia coli* zählt zu den meist genutzten prokaryotischen Organismen in der industriellen Produktion von Proteinen. Die Bakterien sind jedoch nicht in der Lage, Proteine korrekt zu falten und alle post-translationalen Modifikationen auszuführen. Die Ausbildung von intra- oder intermolekularen Disulfiden sowie die Glykosylierung von Proteinen sind nicht möglich [131]. Hohe Proteinexpressionen verstärken den Anteil fehlerhaft gefalteter Proteine, was zu proteolytischem Abbau in den Bakterien oder Zusammenlagerung der rekombinanten Proteinen untereinander zu so genannten Einschlusskörperchen führt [131]. Daraus resultieren Proteine, welche keine biologische Aktivität aufweisen. Die mit Hilfe prokaryotischer Proteine generierten mAK sind daher häufig nicht in der Lage, native Proteine in der Zelle zu detektieren.

Demgegenüber ergeben sich aus Expressionssystemen mit eukaryotischen Zellen korrekt gefaltete Proteine, jedoch ist die generierte Menge an Protein deutlich geringer und der Prozess langwieriger. Eine weitere Möglichkeit für die Generierung spezifischer mAK bietet die DNA-Immunisierung, eine Methode, welche ursprünglich für die Herstellung virusspezifischer Antigene etabliert wurde [132]. Dabei wird ein Antigen-kodierender eukaryotischer Expressionsvektor mit Hilfe einer Genkanone in das Gewebe appliziert. Der Vorteil liegt in der Produktion von korrekt gefaltetem Protein im Wirt, jedoch reicht eine alleinige DNA-Immunisierung nicht aus. Für eine adäquate Immunreaktion ist die zusätzliche Boosterung mit rekombinantem Protein notwendig. Zudem ist die Methode mit hohen Kosten verbunden.

Die Herstellung spezifischer mAK, welche intrazytoplasmatisch Zytokine detektieren, ist in der Hühnerimmunologie noch nicht weitreichend etabliert. Dies schränkt die Phänotypisierung der zytokinspezifischen Zellen im Huhn stark ein. Lambrecht et al. und Yun et al. entwickelten im Jahr 2000 die ersten aviären zytokinspezifischen mAK gegen gg IFN- $\gamma$  [133, 134]. Kurz darauf generierten Rothwell et al. gg IL-2-spezifische mAK [135]. Diese spezifischen Antikörper sind in der Lage, gg IFN- $\gamma$  beziehungsweise gg IL-2 im ELISA oder im Western Blot nachzuweisen. Die IL-2-spezifischen mAK können gg IL-2 jedoch nicht intrazytoplasmatisch anfärben und sind somit für durchflusszytometrische Analysen von keinem Nutzen. Ariaans et al. etablierten eine intrazytoplasmatische Färbung mit einem von Lambrecht et al. generierten IFN- $\gamma$  spezifischen mAK [136]. Eine niederfrequente CD4<sup>+</sup> sowie CD8<sup>+</sup> Zellpopulation der Milz ist mit dem IFN- $\gamma$ -spezifischen mAK anfärbbar. Des Weiteren generierten Wu et al. anti-gg IL10 mAK mit der Eigenschaft, gg IL-10 intrazytoplasmatisch in Makrophagen detektieren zu können [137]. IL-17A-spezifische Antikörper wurden durch die Arbeitsgruppe von Yoo et al. generiert. Diese färben rekombinantes gg IL-17A im ELISA sowie im Lysat der Zelllinie CU205 im Western Blot [138]. Demzufolge sind bisher IFN- $\gamma$ - sowie IL-10- spezifische mAK für die Charakterisierung interleukinspezifischer Hühnerzellen auf Einzelzellebene durch intrazytoplasmatische Färbung verfügbar. Aufgrund der fehlenden Analysemethoden sind die im Säuger gut definierten T-Helferzellsubpopulationen Th1, Th2 und Th17 [139, 140] bei Vögeln noch nicht eindeutig charakterisiert. Eine definitive Charakterisierung der T-Zellantwort auf Einzelzellebene ist nur mit Hilfe zytokinspezifischer mAK für die intrazytoplasmatische Färbung in Kombination mit zellpopulationsspezifischen Oberflächenmarkern möglich.

Ziel dieser Arbeit war, durch die Expression von Hühnerzytokinen auf der Zelloberfläche von eukaryotischen Zellen über einen Glykosylphosphatidylinositol (GPI)-Anker, eine neuartige Methode zur mAK-Herstellung zu etablieren. Mit dieser Methode sollen insbesondere mAK generiert werden, die für intrazelluläre Färbungen in durchflusszytometrischen Analysen eingesetzt werden können. Zudem soll durch diese Methode die Notwendigkeit von großen Mengen aufgereinigtem, löslichem Zytokin für die Immunisierung und das Screening der Hybridome umgangen werden. Der GPI-Anker ist eine post-translationale Modifikation von Proteinen und besteht aus einer Phosphoethanolaminverbindung für das C-terminale Ende von Proteinen, einem Glykan und einem Phospholipide, das die Plasmamembran durchzieht (Abbildung 4, Seite 34). Dadurch ist der GPI-Anker in der Lage, Proteine an die Zelloberfläche zu binden [141]. Mehr als 250 GPI-gekoppelte Proteine sind innerhalb der Säuger, Pilze, Pflanzen, Insekten und Protozoen identifiziert. GPI-gekoppelte Proteine weisen unterschiedliche biologische Funktionen auf. Viele besitzen enzymatische Aktivität [141]. Das Glykangerüst aus Mannose, Glucosamin und Inositol ist dabei hochkonserviert, die Zuckerreste können jedoch variabel modifiziert sein [141].



**Abbildung 4: Glykosylphosphatidylinositol (GPI) -Anker**

Schematische Darstellung des GPI-Ankers auf der Zellmembran. Das Phospholipide durchzieht die Plasmamembran. Das Glykangerüst besteht aus Mannose- $\alpha$ -1,2-Mannose- $\alpha$ -1,6-Mannose- $\alpha$ -1,4-Glucosamin- $\alpha$ -1,6-Inositol [141]. Das C-terminale Ende des Proteins ist über ein Phosphoethanolamin mit dem GPI-Anker verbunden. (Man: Mannose; Glu: Glucosamin; Inos: Inositol)

Die Generierung spezifischer Antikörper mit Hilfe membrangebundener Proteine wurde bereits für drei Proteine des *Plasmodium falciparum*, dem infektiösen Agens der tropischen Malaria, getestet [142]. Im Unterschied zu Zytokinen, handelte es sich bei diesen Antigenen um natürlicherweise GPI-gekoppelte Proteine auf der Zelloberfläche der extrazellulären Form von *Plasmodium falciparum*. Aufgrund phylogenetischer Unterschiede wurden die Antigene der Protozoen nicht durch einen GPI-Anker, sondern durch ein murines Glykophorin A auf der Oberfläche der humanen embryonalen Nierenzelllinie HEK fixiert [142]. Die Hybridome wurden durch Immunofluoreszenz-Färbungen auf den transfizierten HEK getestet und selektiert. Daraus resultierten antigenspezifische mAK, die das endogene Protein in seiner nativen Form detektieren [142]. In der Hühnerimmunologie wurden auch bereits Versuche mit membrangebundenen Zytokinen durchgeführt. Yang et al. injizierten virusmembrangebundenes gg IL-2 als immunstimulatorisches Adjuvans in der Immunisierung von Hühnern gegen Influenza, was eine deutliche Steigerung des antiviralen Antikörpertiters zu Folge hatte [143]. Dafür wurde eine canine Nierenzelllinie mit einem Konstrukt transfiziert, das die IL-2-kodierende Region mit der kodierenden Region der transmembranen Domäne der viralen Neuraminidase verknüpft. Bioassays belegen die biologische Aktivität des membrangebundenen gg IL-2. Die Infektion der caninen Zelllinie mit Influenzaviren führt zu einer Inkorporation der membrangebundenen Zytokine in das Virus. Das aus der infizierten Zelllinie gewonnene Virus wurde inaktiviert und auf die Expression des membrangebundenen Zytokins mittels Immunofluoreszenz getestet. Diese Studie zeigt, dass membrangebundenes Zytokin die Immunreaktion im Wirt stimulieren kann [143].

In dieser Doktorarbeit wurden für die Charakterisierung der gg IL-17 Zytokine, HEK-Zellen mit GPI-gekoppelten gg IL-17A beziehungsweise gg IL-17F transfiziert. Beide gg IL-17 Zytokine besitzen für die Detektion ein FLAG-Epitop. Diese transfizierten Zellen wurden für die Immunisierung sowie das Screening der Hybridome in der Durchflusszytometrie genutzt. Indem die Zytokine in ihrer nativen Konformation auf den Zellen präsentiert werden, wird die Wahrscheinlichkeit der Generierung von mAK mit der Eigenschaft, endogene IL-17 Zytokine erkennen und binden zu können, erhöht. Aufgrund dieses Testverfahrens wurden die Hybridome auf ihre Fähigkeit, IL-17 in der Durchflusszytometrie zu erkennen, selektiert. Die Untersuchung des Färbeverhaltens der Hybridome auf transfizierten HEK-Zellen im Vergleich zu nicht-transfizierten HEK-Zellen ist eine effektive und schnelle Methode,

Hybridome zu testen. Zwei gg IL-17A-spezifische mAK (9F11, 10D5) und ein gg IL-17F-spezifischer mAK (1E7) wurden durch das Verfahren generiert. Die mAK zeigen ein zytokinspezifisches Färbeverhalten auf den transfizierten HEK-Zellen. 1E7 weist in allen Färbungen eine geringe Kreuzreaktivität mit der transfizierten Zelllinie für gg IL-17A auf. Dies ist aufgrund der Homologie von 53 % in der Aminosäuresequenz zwischen gg IL-17A und gg IL-17F nicht verwunderlich.

Die Spezifität der Antikörper wurden mit Hilfe rekombinanter gg IL-17 Zytokine weiter untersucht. Durch Inkubation der mAK mit ihrem entsprechenden IL-17 Zytokin wird die Färbung der transfizierten HEK-Zellen gehemmt. Die rekombinanten Zytokine blockieren die Bindungsstelle der mAK. 1E7 wird entsprechend seiner Spezifität von gg IL-17F in seiner Bindung an das GPI-gekoppelte gg IL-17F gehemmt. Die Bindung von 9F11 und 10D5 an das GPI-gekoppelte gg IL-17A wird durch gg IL-17A und nicht durch gg IL-17F reduziert. Daraus lässt sich schließen, dass alle drei mAK spezifisch binden und in der Lage sind, natives Zytokin zu detektieren.

Die biochemische Analyse der rekombinanten Proteine im Western Blot zeigt, dass gg IL-17A und gg IL-17F spontan dimerisieren. Das molekulare Gewicht der reduzierten Zytokine liegt bei 20,0 kDa, das der nicht reduzierten Zytokine bei 40 kDa. Vor dem Hintergrund der Gensequenzanalysen [11] ist es wahrscheinlich, dass gg IL-17A und gg IL-17F, vergleichbar zu den IL-17 Zytokinen der Säuger, einen Zysteinknoten aus Disulfidbrücken in ihrer Struktur aufweisen.

Die biologische Aktivität der rekombinanten gg IL-17A und gg IL-17F Proteine wurde ebenfalls nachgewiesen. In Folge einer Stimulation der Hühner-Makrophagenzelllinie HD11 mit rekombinatem gg IL-17A oder gg IL-17F wird Stickstoffmonoxid konzentrationsabhängig freigesetzt sowie die Expression von IL-6 stimuliert. Die biologische Aktivität der rekombinanten Zytokine wurde durch die generierten mAK 1E7, 9F11 und 10D5 nicht vermindert. Unter den bisher generierten sechzehn IFN- $\gamma$ -spezifischen mAK sind ebenfalls nur drei in der Lage, die biologische Aktivität von IFN- $\gamma$  zu hemmen [133, 134]. Die zytokinspezifischen mAK binden nicht immer an das biologisch aktive, beziehungsweise das rezeptorbindende, Epitop der Zytokine. Damit ist eine Hemmung der Zytokine durch spezifischen mAK nicht immer zu erwarten. Zudem konnte die Bindung der dimeren Hühnerzytokine an den IL-17-Rezeptor der HD11 mittels Durchflusszytometrie dargestellt werden. Übereinstimmend mit den Daten der Säuger IL-17 Zytokine bindet gg IL-17F schwächer an die Hühner-Makrophagenzelllinie, als gg IL-17A [97].

Für das Nutzen der generierten mAK in der Forschung ist ihre Fähigkeit, natives gg IL-17A beziehungsweise gg IL-17F intrazellulär färben zu können, ausschlaggebend. Für die Validierung der mAK wurden HEK-Zellen mit gg IL-17A oder gg IL-17F transfiziert. 9F11 und 10D5 färben gg IL-17A in allen transfizierten Zellen. Dementsprechend färbt 1E7 die mit gg IL-17F transfizierten Zellen und weist, wie in der Oberflächenfärbung, eine geringe Kreuzreaktivität mit gg IL-17A auf. Die Expression von gg IL-17A und gg IL-17F kann mit Hilfe der generierten mAK ebenfalls in primären Hühnerzellen nachgewiesen werden.

Für die Maus und den Mensch sind IL-17A- und IL-17F-positive Zellen weitestgehend identifiziert. Die Zytokine werden zu einem Großteil von aktivierten T-Zellen, insbesondere den Th17-Zellen, freigesetzt [40, 47]. Die Studien der letzten Jahre zeigen, dass beide Zytokine ebenfalls durch eine große Gruppe von Zellen des angeborenen Immunsystems bereits sehr früh während einer Infektion exprimiert werden [74]. Der proinflammatorische Stimulus von IL-17A und IL-17F ist für eine adäquate und schnelle Immunreaktion, insbesondere an den epithelialen Oberflächen, von Bedeutung. Ausschlaggebend hierbei ist die schnelle Aktivierung und Rekrutierung der neutrophilen Granulozyten durch die IL-17 Zytokine. Aus diesem Grund ist eine frühe Expression von IL-17A und IL-17F, unabhängig von der Antigenaktivierung der T-Zellen, unerlässlich. Die  $\gamma\delta$  T-Zellen nehmen in diesem Zusammenhang, durch ihre TCR-unabhängige Aktivierung der IL-17 Expression, eine wichtige Position ein.

Im Huhn ist die Expression von gg IL-17A und gg IL-17F in Mitogen stimulierten Milzlymphozyten sowie im Darm nachweisbar [11]. Infolge einer Infektion mit Eimerien werden die Th17-spezifische Zytokine IL-1 $\beta$ , IL-6 und gg IL-17A hochreguliert [124], was eine Freisetzung der Hühner IL-17 Zytokine durch aktivierte T-Zellen vermuten lässt. Aus diesem Grund wurden Milzlymphozyten des Haushuhnes auf ihre intrazytoplasmatische Expression von IL-17 sowie ihrer Oberflächenexpression von CD4 als Marker für T-Helferzellen untersucht. Die gg IL-17A spezifischen mAK 9F11 und 10D5 färben, übereinstimmend mit der Vermutung, eine abgrenzbare Population der CD4<sup>+</sup> Milzlymphozyten für gg IL-17A an. Dies ist ein weiterer Nachweis für Th17-Zellen beim Huhn. 1E7 färbt eine etwas kleinere Population gg IL-17F-, CD4- doppelt positiver Milzzellen. Dies lässt vermuten, dass gg IL-17F in CD4<sup>+</sup> Milzzellen geringer exprimiert wird, als gg IL-17A. Kim et al. zeigten, dass gg IL-17A auf RNA-Ebene in Mitogen stimulierten Milzlymphozyten ebenfalls stärker exprimiert wird, als gg IL-17F [11]. Dies ist gleichermaßen nach einer Infektion mit *Salmonella gallinarum* in der Milz nachweisbar [123].

Im Gegensatz dazu ist in murinen Milzlymphozyten, welche mit den Th17-spezifischen Zytokinen IL-6, TGF- $\beta$  und IL-1 aktiviert wurden, die Expression von IL-17F höher, als die des IL-17A/IL-17F-Heterodimers sowie des IL-17A-Homodimers. Nach Re-Stimulation mit IL-23, anti-IL-4 mAK und anti-IFN- $\gamma$ -mAK ist das höchste RNA-Level für das IL-17A/IL-17F-Heterodimer in den murinen Milzlymphozyten nachweisbar [144]. In humanen CD4<sup>+</sup>-Blutlymphozyten ist nach einer Stimulation mit Th17-spezifischen Zytokinen IL-6, IL-1, TGF- $\beta$ , IL-23 sowie anti-IL-4 mAK und anti-IFN $\gamma$  mAK, IL-17F ebenfalls stärker exprimiert, als IL-17A [99]. Für das Haushuhn ist ein Th17-stimulierendes Kultivierungssystem noch nicht etabliert, wodurch die Expressionsanalysen der IL-17 Zytokine in diesem Fall nicht direkt gegenüber gestellt werden können. Da es sich bei den untersuchten Hühnern um gesunde Tiere handelt und die Milzzellen vor der Färbung nur mit Hilfe von Phorbol-Myristat-Acetat und Ionomycin aktiviert und nicht zusätzlich mit Th17-spezifischen Zytokinen stimuliert wurden, liegt der prozentuale Anteil der CD4-, gg IL-17A- beziehungsweise gg IL-17F- doppelt positiven Milzlymphozyten in einem zu erwarteten prozentualen Bereich.

Hühner weisen im Gegensatz zu Säugern einen sehr hohen Anteil von  $\gamma\delta$  T-Zellen auf [7]. Ihre Regulation sowie ihr Zytokinspektrum sind jedoch weitgehend unerforscht. Mit der Zytokinkombination aus gg IL-2 und gg IL-12 konnte ein Kultursystem entwickelt werden, das die Proliferation der  $\gamma\delta$  T-Zellen in Hühnermilzzellen stimuliert. Für eine weitere Charakterisierung  $\gamma\delta$  T-Zellen wurden Milzlymphozyten über eine Woche mit der Zytokinkombination aus gg IL-2 und gg IL-12 stimuliert und mit den mAK 1E7 und 10D5 gefärbt. Die Expression von gg IL-17A und gg IL-17F ist in den proliferierenden TCR1<sup>+</sup> Lymphoblasten nachweisbar. Es besteht eine stimulationsabhängige Steigerung der Expression beider Zytokine. Dies kann entweder auf den erhöhten Anteil der proliferierenden  $\gamma\delta$  T-Zellen in der Gesamtheit der Zellen oder auf den stimulierenden Effekt von gg IL-2 und gg IL-12 auf die  $\gamma\delta$  T-Zellen und deren Zytokinexpression zurückgeführt werden. Für das Verständnis der IL-17-Reaktionen in den kultivierten  $\gamma\delta$  T-Zellen bedarf es weiterer Untersuchungen.

Zusammenfassend ist das Verfahren, Zytokine über einen GPI-Anker auf der Oberfläche von eukaryotischen Zellen zu fixieren, eine erfolgreiche Methode für die Generierung spezifischer mAK. Die Notwendigkeit von großen Mengen an aufgereinigtem, rekombinantem Zytokin wird dabei umgangen.

Die durchgeführten Untersuchungen zeigen, dass die generierten interleukin-spezifischen mAK 1E7, 9F11 und 10D5 natives gg IL-17A, beziehungsweise gg IL-17F, in primären Zellen intrazytoplasmatisch detektieren. Dies ermöglicht, zusammen mit den entsprechenden Oberflächenmarkern, eine qualitative Analyse IL-17A- und IL-17F- produzierender Zellen auf Einzelzellebene.

In folgenden Studien soll die Expression der IL-17 Zytokine unter Verwendung der mAK in unterschiedlichen Geweben des Huhnes untersucht werden. Dabei sollen die IL-17A- und IL-17F- positiven Zellen genau phänotypisiert werden, was für die weitere Charakterisierung möglicher T-Helferzellpopulationen im Haushuhn von Bedeutung ist.

Insbesondere die Zytokinexpressionen der  $\gamma\delta$  T-Zellen steht im Fokus weiterer Untersuchungen. Im Säuger können IL-17-positive und IFN- $\gamma$ -positive  $\gamma\delta$  Zellpopulationen mit Hilfe von Oberflächenmarkern differenziert werden. Dies konnte im Huhn bis jetzt noch nicht nachgewiesen werden. Durch die generierten mAK sind nun die notwendigen Voraussetzungen gegeben, die Expressionsprofile dieser zwei wichtigen Zytokine innerhalb der  $\gamma\delta$  T-Zellen des Huhnes zu untersuchen.

Parallel dazu ist die Etablierung eines Th17-spezifischen Kultursystems für die weitere Charakterisierung der IL-17 Zytokine beim Haushuhn von Bedeutung.

Des Weiteren kann die Bedeutung und Regulation der IL-17 Zytokine in Infektionsversuchen, insbesondere in Kokzidieninfektionen im Darm, mit Hilfe der generierten mAK 1E7, 9F11 und 10D5 genauer untersucht werden.



## 6 Zusammenfassung

### **Membrangebundenes IL-17A und IL-17F zur Herstellung spezifischer monoklonaler Antikörper für die intrazytoplasmatische Zytokinfärbung**

Die Charakterisierung der Zytokine beim Haushuhn ist Schwerpunkt vieler Forschungsarbeiten. Insbesondere die IL-17 Zytokine stehen, aufgrund ihrer immunregulatorischen Funktionen im Säuger, im Fokus der Forschung. Fünf homologe IL-17 Zytokine wurden im Genom des Haushuhnes identifiziert. Ihre Regulation und Funktion ist jedoch weitgehend unerforscht. Die Phänotypisierung zytokinspezifischer Zellen im Haushuhn ist nur eingeschränkt möglich und setzt die Generierung spezifischer mAK voraus. Die Herstellung zytokinspezifischer mAK basiert auf der Immunisierung von löslichem Protein.

Ziel dieser Arbeit war die Etablierung einer neuen Methode, welche die Notwendigkeit großer Mengen an aufgereinigtem Zytokin umgeht. Dafür wurden Hühnerzytokine über einen GPI-Anker auf der Oberfläche von eukaryotischen Zellen fixiert. Es wurden zwei stabile Zelllinien generiert, welche gg IL-17A beziehungsweise gg IL-17F über einen GPI-Anker auf ihrer Oberfläche hoch exprimieren. Die transfizierten Zelllinien wurden für die Immunisierung und das Screening der Hybridome in der Durchflusszytometrie genutzt. Auf Basis des Färbeverhaltens der Hybridome auf transfizierten Zellen im Vergleich zu nicht transfizierten Zellen wurden zwei gg IL-17A-spezifische mAK (9F11, 10D5) und ein gg IL-17F-spezifischer mAK (1E7) selektiert. Die Spezifität der mAK wurde aufgrund ihrer Hemmung durch rekombinante gg IL-17-Proteine bewiesen. Western Blot Analysen der rekombinanten Zytokine weisen auf eine dimere Proteinstruktur hin. Ein proinflammatorischer Effekt von gg IL-17A und gg IL-17F auf die Makrophagenzelllinie HD11 ist zudem nachweisbar. Beide Zytokine induzieren die Expression von IL-6 sowie die Freisetzung von Stickstoffmonoxid.

Die generierten mAK färben natives gg IL-17A und gg IL-17F intrazellulär in transfizierten eukaryotischen Zelllinien sowie in primären Hühnerzellen. In der Milz ist eine Population gg IL-17A- sowie gg IL-17F- produzierender CD4<sup>+</sup> Lymphozyten darstellbar, wobei es sich wahrscheinlich um Th17-Zellen handelt.

Zusammenfassend stellt das Verfahren, Zytokine über einen GPI-Anker auf eukaryotischen Zellen zu exprimieren, eine erfolgreiche Methode dar, spezifische mAK zu produzieren. Die generierten mAK 1E7, 9F11 und 10D5 repräsentieren, durch ihre Fähigkeit Zytokine intrazytoplasmatisch detektieren zu können, ein wichtiges Instrument, die Expression sowie die biologische Funktion von gg IL-17A und gg IL-17F im Haushuhn weiter zu charakterisieren und die IL-17-produzierenden Zellen auf Einzelzelebene zu untersuchen.

## 7 Summary

### **Membrane bound IL-17A und IL-17F for the generation of specific monoclonal antibodies applicable for intracellular cytokine staining**

The characterization of chicken cytokines is in the focus of many studies. Because of their immunoregulatory properties in mammals, the IL-17 cytokines are of high interest. Five homologous IL-17 cytokines have been identified in the chicken genome, but their regulation and functions are mostly unknown. The phenotypic characterization of cytokine specific cells in the chicken is restricted and depends on the availability of specific monoclonal antibodies (mab). The generation of specific mab is based on the immunization with soluble proteins.

The aim of this study was to establish a new method bypassing the need for a high amount of purified cytokines. For this purpose, chicken cytokines were attached to eukaryotic cells via a glycosylphosphatidylinositol (GPI) anchor. Two stable cell lines were generated expressing GPI gg IL-17A and GPI IL-17F respectively. The transfected cell lines were used for immunization and screening of the hybridomas by flow cytometry. According to their staining profile on transfected cells versus non-transfected cells two gg IL-17A specific mab (9F11, 10D5) and one gg IL-17F (1E7) specific mab were selected. The mab specificity was verified by inhibition with the appropriate recombinant cytokine. The recombinant proteins showed dimerization in Western Blot. In addition, a proinflammatory effect of gg IL-17A and gg IL-17F on the chicken macrophage cell line HD11 was demonstrated. Both cytokines induce the expression of IL-6 as well as the release of nitric oxide by HD11 cells.

The mab detect intracytoplasmatic gg IL-17A and gg IL-17F in transfected cell lines as well as in primary chicken cells. In the spleen a population of gg IL-17A and gg IL-17F producing CD4<sup>+</sup> lymphocytes is detectable, probably representing Th17 cells.

In summary the expression of GPI linked cytokines on eukaryotic cells is a good alternative to generate specific monoclonal antibodies. The generated mab 1E7, 9F11 and 10D5 are applicable for intracellular staining. They represent an important tool to further characterize the expression and biological function of gg IL-17A and gg IL-17F as well as to investigate IL-17 producing cells at the single cell level in the chicken.

## 8 Literaturverzeichnis

1. Oláh, I., N. Nagy, and L. Vervelde, *Chapter 2 - Structure of the Avian Lymphoid System A2 - Schat, Karel A*, in *Avian Immunology (Second Edition)*, B. Kaspers and P. Kaiser, Editors. 2014, Academic Press: Boston. p. 11-44.
2. Warr, G.W., K.E. Magor, and D.A. Higgins, *IgY: clues to the origins of modern antibodies*. Immunology Today, 1995. **16**(8): p. 392-8.
3. Kaufman, J., et al., *The chicken B locus is a minimal essential major histocompatibility complex*. Nature, 1999. **401**(6756): p. 923-5.
4. Reynaud, C.-A., et al., *A single rearrangement event generates most of the chicken immunoglobulin light chain diversity*. Cell, 1985. **40**(2): p. 283-291.
5. Reynaud, C.-A., et al., *A hyperconversion mechanism generates the chicken light chain preimmune repertoire*. Cell, 1987. **48**(3): p. 379-388.
6. Reynaud, C.A., et al., *Somatic hyperconversion diversifies the single Vh gene of the chicken with a high incidence in the D region*. Cell, 1989. **59**(1): p. 171-83.
7. Chen, C.H., et al., *T Cell Development in the Chicken*. Poultry Science, 1994. **73**(7): p. 1012-1018.
8. Kaiser, P., et al., *A genomic analysis of chicken cytokines and chemokines*. Journal of interferon & cytokine research, 2005. **25**(8): p. 467-84.
9. Jakowlew, S.B., et al., *Complementary Deoxyribonucleic Acid Cloning of a Messenger Ribonucleic Acid Encoding Transforming Growth Factor  $\beta$  4 from Chicken Embryo Chondrocytes*. Molecular Endocrinology, 1988. **2**(12): p. 1186-1195.
10. Schneider, K., et al., *cDNA cloning of biologically active chicken interleukin-18*. Journal of interferon & cytokine research, 2000. **20**(10): p. 879-83.
11. Kim, W.H., et al., *Chicken IL-17F: identification and comparative expression analysis in Eimeria-infected chickens*. Developmental and comparative immunology, 2012. **38**(3): p. 401-409.
12. Schneider, K., et al., *Chicken interleukin-6. cDNA structure and biological properties*. European journal of biochemistry, 2001. **268**(15): p. 4200-6.
13. Min, W. and H.S. Lillehoj, *Isolation and characterization of chicken interleukin-17 cDNA*. Journal of interferon & cytokine research, 2002. **22**(11): p. 1123-1128.
14. Hong, Y.H., et al., *Cloning and functional characterization of chicken interleukin-17D*. Veterinary immunology and immunopathology, 2008. **126**(1-2): p. 1-8.
15. Cho, J.S., et al., *IL-17 is essential for host defense against cutaneous Staphylococcus aureus infection in mice*. The Journal of clinical investigation, 2010. **120**(5): p. 1762-1773.

16. Ishigame, H., et al., *Differential roles of interleukin-17A and -17F in host defense against mucoepithelial bacterial infection and allergic responses*. Journal of immunology, 2009. **30**(1): p. 108-119.
17. Huang, W., et al., *Requirement of interleukin-17A for systemic anti-Candida albicans host defense in mice*. The Journal of infectious diseases, 2004. **190**(3): p. 624-631.
18. Kelly, M.N., et al., *Interleukin-17/Interleukin-17 Receptor-Mediated Signaling Is Important for Generation of an Optimal Polymorphonuclear Response against Toxoplasma gondii Infection*. Infection and immunity, 2005. **73**(1): p. 617-621.
19. Kolls, J.K. and A. Linden, *Interleukin-17 family members and inflammation*. Immunity, 2004. **21**(4): p. 467-476.
20. Moseley, T.A., et al., *Interleukin-17 family and IL-17 receptors*. Cytokine & growth factor reviews, 2003. **14**(2): p. 155-174.
21. Weaver, C.T., et al., *IL-17 family cytokines and the expanding diversity of effector T cell lineages*. Annual review of immunology, 2007. **25**: p. 821-852.
22. Rouvier, E., et al., *CTLA-8, cloned from an activated T cell, bearing AU-rich messenger RNA instability sequences, and homologous to a herpesvirus saimiri gene*. Journal of immunology, 1993. **150**(12): p. 5445-56.
23. Yao, Z., et al., *Human IL-17: a novel cytokine derived from T cells*. Journal of immunology, 1995. **155**(12): p. 5483-5486.
24. Yao, Z., et al., *Herpesvirus saimiri encodes a new cytokine, IL-17, which binds to a novel cytokine receptor*. Journal of immunology, 2011. **187**(9): p. 4392-402.
25. Pappu, R., et al., *The IL-17 family cytokines in immunity and disease*. Journal of clinical immunology, 2010. **30**(2): p. 185-95.
26. Gunimaladevi, I., R. Savan, and M. Sakai, *Identification, cloning and characterization of interleukin-17 and its family from zebrafish*. Fish & shellfish immunology, 2006. **21**(4): p. 393-403.
27. Han, Q., et al., *Characterization of Lamprey IL-17 Family Members and Their Receptors*. Journal of Immunology, 2015. **195**(11): p. 5440-51.
28. Fallon, P.G., et al., *Identification of an interleukin (IL)-25-dependent cell population that provides IL-4, IL-5, and IL-13 at the onset of helminth expulsion*. The Journal of experimental medicine, 2006. **203**(4): p. 1105-16.
29. Li, H., et al., *Cloning and characterization of IL-17B and IL-17C, two new members of the IL-17 cytokine family*. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 2000. **97**(2): p. 773-8.
30. Starnes, T., et al., *Cutting edge: IL-17D, a novel member of the IL-17 family, stimulates cytokine production and inhibits hemopoiesis*. Journal of immunology, 2002. **169**(2): p. 642-6.

31. Hymowitz, S.G., et al., *IL-17s adopt a cystine knot fold: structure and activity of a novel cytokine, IL-17F, and implications for receptor binding*. The EMBO journal, 2001. **20**(19): p. 5332-5341.
32. McDonald, N.Q. and W.A. Hendrickson, *A structural superfamily of growth factors containing a cystine knot motif*. Cell, 1993. **73**(3): p. 421-424.
33. Sun, P.D. and D.R. Davies, *The cystine-knot growth-factor superfamily*. Annual review of biophysics and biomolecular structure, 1995. **24**: p. 269-91.
34. Starnes, T., et al., *Cutting edge: IL-17F, a novel cytokine selectively expressed in activated T cells and monocytes, regulates angiogenesis and endothelial cell cytokine production*. Journal of immunology, 2001. **167**(8): p. 4137-40.
35. Shi, Y., et al., *A novel cytokine receptor-ligand pair. Identification, molecular characterization, and in vivo immunomodulatory activity*. Journal of Biological Chemistry, 2000. **275**(25): p. 19167-76.
36. Chang, S.H. and C. Dong, *A novel heterodimeric cytokine consisting of IL-17 and IL-17F regulates inflammatory responses*. Cell research, 2007. **17**(5): p. 435-440.
37. Wright, J.F., et al., *Identification of an interleukin 17F/17A heterodimer in activated human CD4+ T cells*. Journal of Biological Chemistry, 2007. **282**(18): p. 13447-13455.
38. Fossiez, F., et al., *Interleukin-17*. International reviews of immunology, 1998. **16**(5-6): p. 541-51.
39. Jin, W. and C. Dong, *IL-17 cytokines in immunity and inflammation*. Emerging Microbes & Infections, 2013. **2**: p. e60.
40. Park, H., et al., *A distinct lineage of CD4 T cells regulates tissue inflammation by producing interleukin 17*. Nature immunology, 2005. **6**(11): p. 1133-1141.
41. Dong, C., *Diversification of T-helper-cell lineages: finding the family root of IL-17-producing cells*. Nature reviews immunology, 2006. **6**(4): p. 329-33.
42. Stark, M.A., et al., *Phagocytosis of apoptotic neutrophils regulates granulopoiesis via IL-23 and IL-17*. Immunity, 2005. **22**(3): p. 285-94.
43. Mangan, P.R., et al., *Transforming growth factor-beta induces development of the T(H)17 lineage*. Nature, 2006. **441**(7090): p. 231-4.
44. Weaver, C.T., et al., *Th17: an effector CD4 T cell lineage with regulatory T cell ties*. Immunity, 2006. **24**(6): p. 677-88.
45. Bettelli, E., et al., *Reciprocal developmental pathways for the generation of pathogenic effector TH17 and regulatory T cells*. Nature, 2006. **441**(7090): p. 235-8.
46. Veldhoen, M., et al., *TGFbeta in the context of an inflammatory cytokine milieu supports de novo differentiation of IL-17-producing T cells*. Immunity, 2006. **24**(2): p. 179-89.

47. Aggarwal, S., et al., *Interleukin-23 promotes a distinct CD4 T cell activation state characterized by the production of interleukin-17*. The Journal of biological chemistry, 2003. **278**(3): p. 1910-1914.
48. Chen, W., et al., *Conversion of peripheral CD4+CD25- naive T cells to CD4+CD25+ regulatory T cells by TGF-beta induction of transcription factor Foxp3*. The Journal of experimental medicine, 2003. **198**(12): p. 1875-86.
49. Fantini, M.C., et al., *Cutting edge: TGF-beta induces a regulatory phenotype in CD4+CD25- T cells through Foxp3 induction and down-regulation of Smad7*. Journal of immunology, 2004. **172**(9): p. 5149-53.
50. Hori, S., T. Nomura, and S. Sakaguchi, *Control of regulatory T cell development by the transcription factor Foxp3*. Science, 2003. **299**(5609): p. 1057-61.
51. Fontenot, J.D., M.A. Gavin, and A.Y. Rudensky, *Foxp3 programs the development and function of CD4+CD25+ regulatory T cells*. Nature immunology, 2003. **4**(4): p. 330-6.
52. Khattri, R., et al., *Pillars Article: An Essential Role for Scurfin in CD4+CD25+ T Regulatory Cells*. Nat. Immunol. 2003. **4**: 337-342. Journal of immunology, 2017. **198**(3): p. 993-998.
53. Ivanov, I.I., et al., *The orphan nuclear receptor RORgamma directs the differentiation program of proinflammatory IL-17+ T helper cells*. Cell, 2006. **126**(6): p. 1121-33.
54. Yang, X.O., et al., *STAT3 regulates cytokine-mediated generation of inflammatory helper T cells*. Journal of Biological Chemistry, 2007. **282**(13): p. 9358-63.
55. Chung, Y., et al., *Critical regulation of early Th17 cell differentiation by interleukin-1 signaling*. Immunity, 2009. **30**(4): p. 576-87.
56. Nurieva, R., et al., *Essential autocrine regulation by IL-21 in the generation of inflammatory T cells*. Nature, 2007. **448**(7152): p. 480-3.
57. Oppmann, B., et al., *Novel p19 protein engages IL-12p40 to form a cytokine, IL-23, with biological activities similar as well as distinct from IL-12*. Immunity, 2000. **13**(5): p. 715-25.
58. Batten, M., et al., *Interleukin 27 limits autoimmune encephalomyelitis by suppressing the development of interleukin 17-producing T cells*. Nature immunology, 2006. **7**(9): p. 929-36.
59. Chen, Z., et al., *Selective regulatory function of Socs3 in the formation of IL-17-secreting T cells*. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 2006. **103**(21): p. 8137-42.
60. Harrington, L.E., et al., *Interleukin 17-producing CD4+ effector T cells develop via a lineage distinct from the T helper type 1 and 2 lineages*. Nature immunology, 2005. **6**(11): p. 1123-32.
61. Kawaguchi, M., et al., *Identification of a novel cytokine, ML-1, and its expression in subjects with asthma*. Journal of immunology, 2001. **167**(8): p. 4430-5.

62. Liu, S.J., et al., *Induction of a distinct CD8 Tnc17 subset by transforming growth factor-beta and interleukin-6*. Journal of leukocyte biology, 2007. **82**(2): p. 354-60.
63. Chien, Y.H. and M. Bonneville, *Gamma delta T cell receptors*. Cellular and molecular life sciences, 2006. **63**(18): p. 2089-94.
64. Reynolds, J.M., P. Angkasekwina, and C. Dong, *IL-17 family member cytokines: regulation and function in innate immunity*. Cytokine & growth factor reviews, 2010. **21**(6): p. 413-423.
65. Lockhart, E., A.M. Green, and J.L. Flynn, *IL-17 production is dominated by gammadelta T cells rather than CD4 T cells during Mycobacterium tuberculosis infection*. Journal of Immunology, 2006. **177**(7): p. 4662-9.
66. Hamada, S., et al., *IL-17A produced by gammadelta T cells plays a critical role in innate immunity against listeria monocytogenes infection in the liver*. Journal of Immunology, 2008. **181**(5): p. 3456-63.
67. Chien, Y.H., X. Zeng, and I. Prinz, *The natural and the inducible: interleukin (IL)-17-producing gammadelta T cells*. Trends in immunology, 2013. **34**(4): p. 151-4.
68. Roark, C.L., et al.,  *$\gamma\delta$  T cells: an important source of IL-17*. Current Opinion in Immunology, 2008. **20**(3): p. 353-357.
69. Ribot, J.C., et al., *CD27 is a thymic determinant of the balance between interferon-gamma- and interleukin 17-producing gammadelta T cell subsets*. Nature immunology, 2009. **10**(4): p. 427-36.
70. Rachitskaya, A.V., et al., *Cutting edge: NKT cells constitutively express IL-23 receptor and RORgammat and rapidly produce IL-17 upon receptor ligation in an IL-6-independent fashion*. Journal of immunology, 2008. **180**(8): p. 5167-71.
71. Murphy, K., et al., *Janeway's immunobiology*. 2012, New York: Garland Science.
72. Ferretti, S., et al., *IL-17, produced by lymphocytes and neutrophils, is necessary for lipopolysaccharide-induced airway neutrophilia: IL-15 as a possible trigger*. Journal of Immunology, 2003. **170**(4): p. 2106-12.
73. Li, L., et al., *IL-17 produced by neutrophils regulates IFN- $\gamma$ -mediated neutrophil migration in mouse kidney ischemia-reperfusion injury*. The Journal of Clinical Investigation. **120**(1): p. 331-342.
74. Cua, D.J. and C.M. Tato, *Innate IL-17-producing cells: the sentinels of the immune system*. Nature reviews. Immunology, 2010. **10**(7): p. 479-489.
75. Klose, C.S.N. and D. Artis, *Innate lymphoid cells as regulators of immunity, inflammation and tissue homeostasis*. Nature immunology, 2016. **17**(7): p. 765-774.
76. Pappu, R., S. Rutz, and W. Ouyang, *Regulation of epithelial immunity by IL-17 family cytokines*. Trends in immunology, 2012. **33**(7): p. 343-9.



77. Takatori, H., et al., *Lymphoid tissue inducer-like cells are an innate source of IL-17 and IL-22*. The Journal of experimental medicine, 2009. **206**(1): p. 35-41.
78. Hueber, A.J., et al., *Mast cells express IL-17A in rheumatoid arthritis synovium*. Journal of immunology, 2010. **184**(7): p. 3336-40.
79. Suzuki, S., et al., *Expression of interleukin-17F in a mouse model of allergic asthma*. International archives of allergy and immunology, 2007. **143 Suppl 1**: p. 89-94.
80. Ayabe, T., et al., *The role of Paneth cells and their antimicrobial peptides in innate host defense*. Trends in microbiology, 2004. **12**(8): p. 394-8.
81. Takahashi, N., et al., *IL-17 produced by Paneth cells drives TNF-induced shock*. The Journal of experimental medicine, 2008. **205**(8): p. 1755-61.
82. Ramirez-Carrozzi, V., et al., *IL-17C regulates the innate immune function of epithelial cells in an autocrine manner*. Nature immunology, 2011. **12**(12): p. 1159-66.
83. Iwakura, Y., et al., *Functional specialization of interleukin-17 family members*. Immunity, 2011. **34**(2): p. 149-62.
84. Fort, M.M., et al., *IL-25 induces IL-4, IL-5, and IL-13 and Th2-associated pathologies in vivo*. Immunity, 2001. **15**(6): p. 985-95.
85. Ikeda, K., et al., *Mast cells produce interleukin-25 upon Fc epsilon RI-mediated activation*. Blood, 2003. **101**(9): p. 3594-6.
86. Novatchkova, M., et al., *The STIR-domain superfamily in signal transduction, development and immunity*. Trends in biochemical sciences, 2003. **28**(5): p. 226-9.
87. Chang, S.H., H. Park, and C. Dong, *Act1 adaptor protein is an immediate and essential signaling component of interleukin-17 receptor*. Journal of Biological Chemistry, 2006. **281**(47): p. 35603-7.
88. Schwandner, R., K. Yamaguchi, and Z. Cao, *Requirement of tumor necrosis factor receptor-associated factor (TRAF)6 in interleukin 17 signal transduction*. The Journal of experimental medicine, 2000. **191**(7): p. 1233-40.
89. Liu, C., et al., *Act1, a U-box E3 ubiquitin ligase for IL-17 signaling*. Science signaling, 2009. **2**(92): p. ra63.
90. Shalom-Barak, T., J. Quach, and M. Lotz, *Interleukin-17-induced gene expression in articular chondrocytes is associated with activation of mitogen-activated protein kinases and NF-kappaB*. Journal of Biological Chemistry, 1998. **273**(42): p. 27467-27473.
91. Martel-Pelletier, J., et al., *Mitogen-activated protein kinase and nuclear factor kappaB together regulate interleukin-17-induced nitric oxide production in human osteoarthritic chondrocytes: possible role of transactivating factor mitogen-activated protein kinase-activated protein kinase (MAPKAPK)*. Arthritis and rheumatism, 1999. **42**(11): p. 2399-409.

92. Chang, S.H. and C. Dong, *Signaling of interleukin-17 family cytokines in immunity and inflammation*. Cellular signalling, 2011. **23**(7): p. 1069-1075.
93. Gaffen, S.L., *Structure and signalling in the IL-17 receptor family*. Nature reviews. Immunology, 2009. **9**(8): p. 556-67.
94. Kramer, J.M., et al., *Evidence for ligand-independent multimerization of the IL-17 receptor*. Journal of immunology, 2006. **176**(2): p. 711-5.
95. Haudenschild, D., et al., *Soluble and transmembrane isoforms of novel interleukin-17 receptor-like protein by RNA splicing and expression in prostate cancer*. The Journal of biological chemistry, 2002. **277**(6): p. 4309-16.
96. Tian, E., et al., *Evi27 encodes a novel membrane protein with homology to the IL17 receptor*. Oncogene, 2000. **19**(17): p. 2098-109.
97. Kuestner, R.E., et al., *Identification of the IL-17 receptor related molecule IL-17RC as the receptor for IL-17F*. Journal of immunology, 2007. **179**(8): p. 5462-5473.
98. Toy, D., et al., *Cutting edge: interleukin 17 signals through a heteromeric receptor complex*. Journal of immunology, 2006. **177**(1): p. 36-39.
99. Wright, J.F., et al., *The human IL-17F/IL-17A heterodimeric cytokine signals through the IL-17RA/IL-17RC receptor complex*. Journal of immunology, 2008. **181**(4): p. 2799-805.
100. Lee, J., et al., *IL-17E, a novel proinflammatory ligand for the IL-17 receptor homolog IL-17Rh1*. Journal of Biological Chemistry, 2001. **276**(2): p. 1660-4.
101. Rong, Z., et al., *IL-17RD (Sef or IL-17RLM) interacts with IL-17 receptor and mediates IL-17 signaling*. Cell research, 2009. **19**(2): p. 208-15.
102. Yang, X.O., et al., *Regulation of inflammatory responses by IL-17F*. The Journal of experimental medicine, 2008. **205**(5): p. 1063-1075.
103. Jovanovic, D.V., et al., *IL-17 stimulates the production and expression of proinflammatory cytokines, IL-beta and TNF-alpha, by human macrophages*. Journal of immunology, 1998. **160**(7): p. 3513-3521.
104. Laan, M., et al., *Neutrophil recruitment by human IL-17 via C-X-C chemokine release in the airways*. Journal of immunology, 1999. **162**(4): p. 2347-2352.
105. Schwarzenberger, P., et al., *IL-17 stimulates granulopoiesis in mice: use of an alternate, novel gene therapy-derived method for in vivo evaluation of cytokines*. Journal of immunology, 1998. **161**(11): p. 6383-6389.
106. Fossiez, F., et al., *T cell interleukin-17 induces stromal cells to produce proinflammatory and hematopoietic cytokines*. The Journal of experimental medicine, 1996. **183**(6): p. 2593-2603.
107. Chen, Y., et al., *Stimulation of Airway Mucin Gene Expression by Interleukin (IL)-17 through IL-6 Paracrine/Autocrine Loop*. Journal of Biological Chemistry, 2003. **278**(19): p. 17036-17043.

108. Fujisawa, T., et al., *NF- $\kappa$ B Mediates IL-1 $\beta$ – and IL-17A–Induced MUC5B Expression in Airway Epithelial Cells*. American Journal of Respiratory Cell and Molecular Biology, 2011. **45**(2): p. 246-252.
109. Ruddy, M.J., et al., *Functional cooperation between interleukin-17 and tumor necrosis factor- $\alpha$  is mediated by CCAAT/enhancer-binding protein family members*. Journal of Biological Chemistry, 2004. **279**(4): p. 2559-67.
110. Chang, S.H., et al., *Interleukin-17C promotes Th17 cell responses and autoimmune disease via interleukin-17 receptor E*. Immunity, 2011. **35**(4): p. 611-21.
111. Song, X., et al., *IL-17RE is the functional receptor for IL-17C and mediates mucosal immunity to infection with intestinal pathogens*. Nature immunology, 2011. **12**(12): p. 1151-8.
112. Hurst, S.D., et al., *New IL-17 family members promote Th1 or Th2 responses in the lung: in vivo function of the novel cytokine IL-25*. Journal of immunology, 2002. **169**(1): p. 443-53.
113. Angkasekwinai, P., et al., *Regulation of IL-9 expression by IL-25 signaling*. Nature immunology, 2010. **11**(3): p. 250-6.
114. Khader, S.A., et al., *IL-23 and IL-17 in the establishment of protective pulmonary CD4<sup>+</sup> T cell responses after vaccination and during Mycobacterium tuberculosis challenge*. Nature immunology, 2007. **8**(4): p. 369-77.
115. Rudner, X.L., et al., *Interleukin-23 (IL-23)-IL-17 cytokine axis in murine Pneumocystis carinii infection*. Infection and immunity, 2007. **75**(6): p. 3055-3061.
116. Miyazaki, Y., et al., *IL-17 is necessary for host protection against acute-phase Trypanosoma cruzi infection*. Journal of immunology, 2010. **185**(2): p. 1150-1157.
117. Guiton, R., et al., *Interleukin 17 receptor signaling is deleterious during Toxoplasma gondii infection in susceptible BL6 mice*. The Journal of infectious diseases, 2010. **202**(3): p. 427-35.
118. Min, W., et al., *Recent progress in host immunity to avian coccidiosis: IL-17 family cytokines as sentinels of the intestinal mucosa*. Developmental and comparative immunology, 2013. **41**(3): p. 418-28.
119. Tamura, K., et al., *MEGA5: molecular evolutionary genetics analysis using maximum likelihood, evolutionary distance, and maximum parsimony methods*. Molecular biology and evolution, 2011. **28**(10): p. 2731-9.
120. Yoo, J., et al., *Molecular characterization of duck interleukin-17*. Veterinary immunology and immunopathology, 2009. **132**(2-4): p. 318-22.
121. Wei, S., et al., *Cloning and characterization of goose interleukin-17A cDNA*. Research in veterinary science, 2014. **96**(1): p. 118-23.

122. Kim, W.H., et al., *Molecular cloning, characterization and mRNA expression of duck interleukin-17F*. Veterinary immunology and immunopathology, 2015. **164**(3-4): p. 194-200.
123. Kim, W.H., et al., *Downregulation of chicken interleukin-17 receptor A during Eimeria infection*. Infection and immunity, 2014. **82**(9): p. 3845-3854.
124. Zhang, L., et al., *Eimeria tenella: interleukin 17 contributes to host immunopathology in the gut during experimental infection*. Experimental parasitology, 2013. **133**(2): p. 121-130.
125. Hong, Y.H., et al., *Analysis of chicken cytokine and chemokine gene expression following Eimeria acervulina and Eimeria tenella infections*. Veterinary immunology and immunopathology, 2006. **114**(3-4): p. 209-223.
126. Ryan, U., *Cryptosporidium in birds, fish and amphibians*. Experimental parasitology, 2010. **124**(1): p. 113-20.
127. Zhao, G.H., et al., *The expression dynamics of IL-17 and Th17 response relative cytokines in the trachea and spleen of chickens after infection with Cryptosporidium baileyi*. Parasites & vectors, 2014. **7**: p. 212.
128. Geriletu, et al., *Vaccination of chickens with DNA vaccine expressing Eimeria tenella MZ5-7 against coccidiosis*. Veterinary parasitology, 2011. **177**(1-2): p. 6-12.
129. Ding, X., et al., *Protective immunity against Eimeria acervulina following in ovo immunization with a recombinant subunit vaccine and cytokine genes*. Infection and immunity, 2004. **72**(12): p. 6939-44.
130. Kohler, G. and C. Milstein, *Continuous cultures of fused cells secreting antibody of predefined specificity*. Nature, 1975. **256**(5517): p. 495-497.
131. Baneyx, F. and M. Mujacic, *Recombinant protein folding and misfolding in Escherichia coli*. Nature Biotechnology, 2004. **22**(11): p. 1399-1408.
132. Grange, M.P., et al., *Induction of neutralizing antibodies against HTLV-I envelope proteins after combined genetic and protein immunizations in mice*. DNA and cell biology, 1997. **16**(12): p. 1439-48.
133. Lambrecht, B., et al., *Production of antibodies against chicken interferon- $\gamma$ : demonstration of neutralizing activity and development of a quantitative ELISA*. Veterinary Immunology and Immunopathology, 2000. **74**(1-2): p. 137-144.
134. Yun, C.H., H.S. Lillehoj, and K.D. Choi, *Chicken IFN- $\gamma$  monoclonal antibodies and their application in enzyme-linked immunosorbent assay*. Veterinary Immunology and Immunopathology, 2000. **73**(3-4): p. 297-308.
135. Rothwell, L., A. Hamblin, and P. Kaiser, *Production and characterisation of monoclonal antibodies specific for chicken interleukin-2*. Veterinary Immunology and Immunopathology, 2001. **83**(3-4): p. 149-160.

136. Ariaans, M.P., et al., *ELISPOT and intracellular cytokine staining: novel assays for quantifying T cell responses in the chicken*. Developmental and comparative immunology, 2008. **32**(11): p. 1398-404.
137. Wu, Z., et al., *Analysis of the function of IL-10 in chickens using specific neutralising antibodies and a sensitive capture ELISA*. Developmental and comparative immunology, 2016. **63**: p. 206-12.
138. Yoo, J., et al., *Monoclonal antibodies reactive with chicken interleukin-17*. Veterinary immunology and immunopathology, 2008. **121**(3-4): p. 359-63.
139. Infante-Duarte, C., et al., *Microbial lipopeptides induce the production of IL-17 in Th cells*. Journal of Immunology, 2000. **165**(11): p. 6107-6115.
140. Mosmann, T.R. and R.L. Coffman, *TH1 and TH2 cells: different patterns of lymphokine secretion lead to different functional properties*. Annual review of immunology, 1989. **7**: p. 145-173.
141. Paulick, M.G. and C.R. Bertozzi, *The Glycosylphosphatidylinositol Anchor: A Complex Membrane-Anchoring Structure for Proteins*. Biochemistry, 2008. **47**(27): p. 6991-7000.
142. Dreyer, A.M., et al., *An efficient system to generate monoclonal antibodies against membrane-associated proteins by immunisation with antigen-expressing mammalian cells*. BMC Biotechnology, 2010. **10**(1): p. 87.
143. Yang, Y., et al., *A novel method to incorporate bioactive cytokines as adjuvants on the surface of virus particles*. Journal of interferon & cytokine research, 2009. **29**(1): p. 9-22.
144. Liang, S.C., et al., *An IL-17F/A Heterodimer Protein Is Produced by Mouse Th17 Cells and Induces Airway Neutrophil Recruitment*. Journal of immunology, 2007. **179**(11): p. 7791-7799.

## 9 Danksagung

Mein größter Dank gilt Herrn Prof. Dr. Thomas Göbel für die vertrauensvolle Überlassung des Dissertationsthemas sowie seine stets freundliche und motivierende Betreuung. Seine herausragende fachliche Kompetenz, das stets entgegengebrachte Vertrauen und die tolle menschliche Unterstützung haben maßgeblich zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen.

Bei Frau PD Dr. Birgit Viertlböck und Frau PD Dr. Sonja Härtle sowie Herrn Prof. Dr. Kaspers möchte ich mich herzlich für ihre zahlreichen konstruktiven Ratschläge und ihre fachliche Unterstützung bedanken. Die wissenschaftlichen Diskussionen und kritischen Beiträge waren eine Bereicherung für meine Arbeit.

Ein herzliches Dankeschön an die Mitarbeiter meiner Arbeitsgruppe Daniela Huhle, Lisa Fenzl und Stephanie Scherer für die gute Zusammenarbeit im Labor und das angenehme Arbeitsklima. Im Besonderen möchte ich mich für die hervorragende Einarbeitung durch Bea Sperling bedanken, was mich in den ersten Monaten meiner Arbeit sehr unterstützt hat. Zudem möchte ich mich ganz besonders bei Vanessa Turowski, Dr. Marie-Luise Neulen und Bea Sperling für ihre Freundschaft, ihre Unterstützung und die vielen schönen Momente bedanken.

Den Mitarbeitern der Arbeitsgruppe Deeg und Kaspers danke ich für die angenehme und kollegiale Zusammenarbeit. Ein großes Dankeschön gilt Sieglinde Hirmer, Ingrid Riehl, Marina Kohn und Beatrice Schäfer für ihre stete Hilfsbereitschaft.

Für die gute Betreuung der Tiere und die angenehme Zusammenarbeit möchte ich mich bei Fritz Meggendorfer, Andreas Schöffmann, Daniela Hölle und Thomas Hoschka bedanken.

Bei meinen lieben Freundinnen Simone Seidel, Lisa Hüttner und Julia Zanker möchte ich mich für die Aufmunterungen in schwierigen Phasen, die positive Energie und ihr stets offenes Ohr bedanken. Mein großer Dank gilt außerdem Florian Alexander, der mir durch seine Liebe und seine Unterstützung sehr viel Kraft gegeben hat.

Von ganzem Herzen bedanke ich mich bei meinen Eltern, die immer an mich glauben, mich unterstützen und mit Rat und Geduld an meiner Seite stehen. Ich bin unendlich dankbar, so wundervolle Eltern zu haben.